

Untersuchungen zur Rolle des p75 Neurotrophinrezeptors nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma in der Maus

Maria Christina Gölz



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Joachim Roth
und
aus der Klinik für Anästhesiologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Betreuer: Prof. Dr. Michael Schäfer

Untersuchungen zur Rolle des p75 Neurotrophinrezeptors nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma in der Maus

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Maria Christina Gölz
Tierärztin aus Mainz

Gießen 2015

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. hc. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Joachim Roth
Prof. Dr. Michael Schäfer

Tag der Disputation: 12. April 2016

Für meine Großeltern

Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Ort, Datum

Maria Christina Gölz

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	X
1. EINFÜHRUNG	1
2. LITERATURDISKUSSION	3
2.1. DAS GEHIRN	3
2.1.1. Anatomie des Gehirns	3
2.1.2. Histologie des Gehirns	4
2.1.3. Durch das experimentelle SHT beeinträchtigte Hirnanteile	5
2.1.3.1. Der Cortex.....	5
2.1.3.2. Der Hippocampus	5
2.1.4 Tierartliche Unterschiede	6
2.2. DAS SCHÄDEL-HIRN-TRAUMA	7
2.2.1. Pathophysiologie des SHT	7
2.2.2. SHT beim Menschen	8
2.2.3. SHT beim Tier.....	10
2.2.3.1. Das Tier als Patient	10
2.2.3.2. Das Tier als Versuchstier	12
2.2.4. SHT-Modelle.....	13
2.2.3.1. Controlled Cortical Impact.....	13
2.2.3.2. Fluid Percussion Injury Modell.....	14
2.2.3.3. Weitere SHT-Modelle.....	14
2.2.3.4. SHT-Modelle am Großtier	15
2.3. NEUROTROPHINE UND NEUROTROPHINREZEPTOREN	16
2.3.1. Neurotrophine.....	16
2.3.1.1. Funktionsweise	16
2.3.1.2. Regulation nach SHT	18
2.3.2 Neurotrophinrezeptoren.....	19
2.3.2.1 p75 Neurotrophinrezeptor	19
2.3.2.1.1. Charakteristika	19
2.3.2.1.2. Funktion	20
2.3.2.2. Tyrosin Rezeptor Kinase Rezeptoren.....	21
2.3.2.3 Sortilin	22
2.3.2.4. Regulation nach SHT	23
2.4. PROPOFOL.....	25
2.4.1. Einsatz beim Menschen.....	26
2.4.2. Einsatz beim Tier.....	26
2.4.3. Neuroprotektiver Effekt.....	27
2.4.4. Neurotoxischer Effekt	28
3. MATERIAL.....	30
3.1. GERÄTE	30

3.2. MEDIKAMENTE, CHEMISCHE SUBSTANZEN, PUFFER, REAGENZIEN, LÖSUNGEN UND KITS.....	32
3.3. PRIMER, SONDEN, ASSAYS UND ANTIKÖRPER	36
3.4. VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	39
3.5. SOFTWARE.....	40
4. METHODEN.....	41
4.1. GENEHMIGUNG DER TIERVERSUCHE.....	41
4.2. MÄUSE	41
4.2.1. C57Bl6-N	41
4.2.2. p75NTR <i>knock-out</i> Maus	41
4.2.2.1. Genotypisierung.....	42
4.2.2.2. Verifizierung des KO.....	43
4.2.3. Sortilin <i>knock-out</i> Mäuse.....	43
4.2.3.1. Genotypisierung.....	44
4.2.3.2. Verifizierung des KO.....	44
4.3. MAUSHALTUNG	45
4.3.1. Stall und Käfige.....	45
4.3.2. Fütterung	46
4.3.3. Haltungsparemeter.....	46
4.4. ANÄSTHESIE	48
4.5. CCI.....	49
4.5.1. Durchführung	49
4.5.2. Überwachung der physiologischen Parameter.....	51
4.5.3. Überwachung der Abbruchkriterien	52
4.6. EUTHANASIE.....	52
4.7. HIRNENTNAHME	53
4.7.1. Komplettentnahme mit Kryokonservierung	53
4.7.2. Prozessierung in der Matrix.....	54
4.8. KRYOSTAT.....	55
4.9. HISTOLOGISCHE FÄRBUNG	55
4.9.1. Kresylviolett.....	55
4.9.1.1. Bemessung des Schadensvolumen	56
4.10. MOTORFUNKTIONSANALYSE	57
4.10.1. Neuroscore	57
4.10.2. Rota-Rod	61
4.11. MRNA-EXTRAKTION.....	62
4.11.1. Konzentrationsbestimmung der mRNA	63
4.12. cDNA-SYNTHESE.....	64
4.13. PCR.....	65
4.13.1. qRT-PCR.....	66
4.14. WESTERN BLOT	69
4.14.1. Proteinaufbereitung	69

4.14.1.1. Messung der Proteinkonzentration	69
4.14.2. Elektrophorese	70
4.14.3. Western Blot	71
4.14.4. Auswertung	73
4.15. STUDIENDESIGN	74
4.15.1. Zeitreihe zur Protein-Expression	74
4.15.2. Rolle von p75NTR nach SHT	74
4.15.2.1. Rolle von p75NTR 24 h post SHT (Histologie)	75
4.15.2.2. Rolle von p75NTR 24 h post SHT (Molekularbiologie)	75
4.15.2.3. Rolle von p75NTR 5 d post SHT	76
4.15.3. Effekt der pharmakologischen Inhibition des p75NTR 24 h post SHT	76
4.15.3.1. Ansetzen der TAT-Pep5-/ TAT-Ctrl-Lösungen zum Injizieren	77
4.15.4. Effekt von TAT-Pep5 auf die Neurotoxizität von Propofol nach SHT	78
4.15.4.1. Ansetzen der Propofol-Lösung zum Injizieren	78
4.15.4.2. Histologie nach 72 h	78
4.15.4.3. Proteinanalyse nach 30 h	79
4.15.5. Rolle des Sortilin-Rezeptors nach SHT	80
4.15.5.1. Rolle von Sortilin 24 h post SHT (Histologie)	81
4.15.5.2. Rolle von Sortilin 24 h post SHT (Molekularbiologie)	81
4.15.5.3. Rolle von Sortilin 5 d post SHT	82
4.16. STATISTISCHE AUSWERTUNG	83
4.17. AKKREDITIERUNG	83
5. ERGEBNISSE	84
5.1. VERIFIZIERUNG DER <i>KNOCK-OUT</i> MÄUSE	84
5.1.1. p75NTR	84
5.1.2. Sortilin	85
5.2. ZEITREIHE ZUR PROTEIN-EXPRESSION VON P75NTR, SORTILIN UND α 2-SPECTRIN	86
5.2.1. Protein-Expression p75NTR	86
5.2.2. Protein-Expression Sortilin	87
5.2.3. Protein-Expression α 2-Spectrin-Spaltfragment (145 kDa / 150 kDa)	87
5.3. EINFLUSS EINER GENETISCHEN DEFIZIENZ DES P75NTR NACH SHT	88
5.3.1. Motorfunktionsanalyse	88
5.3.1.1. Neuroscore	88
5.3.1.2. Rota-Rod	88
5.3.2. Gewichtsentwicklung	89
5.3.3. Kontusionsvolumen	90
5.3.4. mRNA-Expression	91
5.3.4.1. Inflammation	91
5.3.4.2. Neurotrophine und ihre Rezeptoren	92
5.3.5. Western Blot	95
5.3.5.1. α 2-Spectrin	95
5.4. EINFLUSS EINER PHARMAKOLOGISCHEN INHIBITION DES P75NTR NACH SHT	96

5.4.1. Neuroscore und Gewichtsentwicklung.....	96
5.4.2. Kontusionsvolumen.....	97
5.5. EINFLUSS EINER PHARMAKOLOGISCHEN INHIBITION DES p75NTR AUF DIE NEUROTOXISCHE WIRKUNG VON PROPOFOL NACH SHT	98
5.5.1. Motorfunktionsanalyse und Gewichtsentwicklung	98
5.5.1.1. Neuroscore und Rota-Rod.....	98
5.5.1.2. Gewichtsentwicklung.....	99
5.5.2. Kontusionsvolumen.....	100
5.5.3. mRNA-Expression	101
5.5.3.1. Inflammation.....	101
5.5.3.2. Neurotrophine und ihre Rezeptoren	102
5.5.4. Western Blot.....	103
5.6. EINFLUSS EINER GENETISCHEN DELETION DES p75NTR-Co-REZEPTORS SORTILIN NACH SHT	104
5.6.1. Motorfunktionsanalyse.....	104
5.6.1.1. Neuroscore.....	104
5.6.1.2. Rota-Rod.....	105
5.6.1.3. Gewichtsentwicklung.....	105
5.6.2. Kontusionsvolumen.....	106
5.6.3. mRNA-Expression	107
5.6.3.1. Inflammation.....	107
5.6.3.2. Neurotrophine und ihre Rezeptoren	108
6. DISKUSSION	109
6.1. VERIFIZIERUNG <i>KNOCK-OUT</i> MAUS.....	109
6.1.1. p75NTR.....	109
6.1.2. Sortilin.....	109
6.2. ZEITREIHE ZUR PROTEIN-EXPRESSION VON p75NTR, SORTILIN UND A2-SPECTRIN	110
6.3. EINFLUSS EINER GENETISCHEN DEFIZIENZ DES p75NTR NACH SHT	111
6.4. EINFLUSS EINER PHARMAKOLOGISCHEN INHIBITION DES p75NTR NACH SHT	115
6.5. EINFLUSS EINER PHARMAKOLOGISCHEN INHIBITION DES p75NTR AUF DIE NEUROTOXISCHE WIRKUNG VON PROPOFOL NACH SHT	117
6.6. EINFLUSS EINER GENETISCHEN DELETION DES p75NTR-Co-REZEPTORS SORTILIN NACH SHT	120
6.7. DISKUSSION AUSGEWÄHLTER METHODISCHER ASPEKTE	122
6.7.1. Analgesie.....	122
6.7.2. Anästhesie:	123
7. ZUSAMMENFASSUNG	124
8. SUMMARY	126
9. VERÖFFENTLICHUNG DER ERGEBNISSE	128
9.1. JOURNAL-ARTIKEL	128
9.2. KONGRESS-ABSTRACTS.....	128

10. ANHANG.....	129
10.1. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	129
10.2. TABELLENVERZEICHNIS.....	131
11. LITERATURVERZEICHNIS	132
12. DANKSAGUNG.....	152
13. LEBENSLAUF	153

Abkürzungsverzeichnis

²	Quadrat-
³	Kubik-
°C	Grad Celsius
% Vol.	Volumenprozent
α	alpha
β	beta
μ	Mikro-
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CA1-3	Cornus ammonis Region 1-3
CCI	<i>controlled cortical impact</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
d	<i>day</i> (dt. Tag)
dest.	destilliert
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (dt. Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
ES	embryonische Stammzellen
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (Maßangabe Zentrifuge, nur bei 4.11. und 4.14.)
GABA	gamma-Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCS	<i>Glasgow Coma Scale</i>
gDNA	genomische DNA
h	<i>hour</i> (dt. Stunde)
HCl	Salzsäure
HD	<i>high-dose</i>
HE	heterozygot
ICP	<i>intracranial pressure</i> (dt. intrakranieller Druck)
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
i.v.	intravenös
JNK-3	c-Jun N-terminale Kinase 3
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KGW	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	<i>knockout</i>
l	Liter
LD	<i>low-dose</i>
m	Meter
M	Molar

max.	maximal
MGCS	modifizierter <i>Glasgow Coma Scale</i>
min	Minute
mind.	mindestens
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ms	Millisekunde
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NGF	<i>neuronal growth factor</i>
NGFR	<i>neuronal growth factor receptor</i> (veraltete Schreibweise von p75NTR)
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P-40
NT-3	Neurotrophin-3
NT-4	Neurotrophin-4
NSS	<i>neurological severity score</i>
OD	optische Dichte
p75NTR	p75 Neurotrophinrezeptor
p75ICD	<i>intracellular domain</i> des p75NTR (dt. intrazelluläre Domäne)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A (Cyclophylin A)
pro-BDNF	Pro-Form des <i>brain derived neurotrophic factor</i>
pro-NGF	Pro-Form des <i>neuronal growth factor</i>
qRT-PCR	<i>quantitative Real Time PCR</i>
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (dt. Ribonukleinsäure)
s	Sekunde
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
Tab.	Tabelle
TAT-Ctrl	TAT-Kontrollpeptid
TAT-Pep5	<i>trans-activator of transcription peptide 5</i>
TBS/TBST	Tris Buffered Saline / + Tween-20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIVA	totale intravenöse Anästhesie
TNF	Tumornekrosefaktor
tPA	<i>tissue plasminogen activator</i>
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
Trk A	Tyrosine kinase receptor A
Trk B	Tyrosine kinase receptor B
Trk C	Tyrosine kinase receptor C
V	Volt
VPS10P	<i>vacuolar protein sorting 10 protein</i>
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einführung

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) ist in Industrieländern die häufigste Todesursache bei jungen Erwachsenen (<45 Jahren) (1, 2). Dies geht zudem mit einer enormen sozioökonomischen Belastung einher (3). Auch für die Veterinärmedizin ist das SHT als Forschungsthema sowohl aus kurativer Sicht als auch aufgrund der Stellung verschiedener Spezies als Modellorganismen im Tierversuch höchst relevant (4, 5).

Neurotrophine und ihre Rezeptoren spielen eine Schlüsselrolle in Bezug auf die neuronale Homöostase. Neurotrophine werden in Form eines Vorläuferproteins (Pro-Neurotrophine) sezerniert und anschließend durch enzymatische Spaltung in ihre mature Form überführt. Die mature Form vermittelt synaptische Plastizität, neuronales Wachstum und Zelldifferenzierung. Die unprozessierten Pro-Neurotrophine lösen vornehmlich apoptotische Signalwege aus (6, 7). Letztere werden durch Bindung an den p75 Neurotrophinrezeptor (p75NTR) vermittelt (8). Dieser Rezeptor ist während der Synaptogenese verstärkt exprimiert und trägt zur Ausbildung eines geordneten und somit funktionellen neuronalen Netzwerks bei (9, 10). Im adulten Gehirn ist p75NTR nur schwach exprimiert, wird jedoch nach zerebralen Insulten wie Ischämie oder Epilepsie erneut hochreguliert (11-13).

Die Entwicklung eines SHT erfolgt biphasisch. Während der Primärinsult durch direkte Krafteinwirkung auf das Gehirn entsteht und nicht beeinflussbar ist, entwickelt sich darauffolgend über verschiedene pathophysiologische Mechanismen der Sekundärschaden (14, 15).

Der Zelltod (Nekrose und Apoptose) gilt als zentraler Prozess, der das sekundäre Schadenswachstum direkt bedingt. P75NTR im Zusammenspiel mit Pro-Neurotrophinen kommt hierbei eine wichtige Stellung als Effektor für den posttraumatischen apoptotischen Zelltod zu (16, 17).

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle von p75NTR bei der sekundären Schadensausweitung nach SHT zu untersuchen. Hierzu werden die Auswirkungen des SHT in funktionell defizienten p75NTR Mausmutanten sowie nach pharmakologischer Inhibition von p75NTR charakterisiert. Die Arbeitshypothese ist, dass der Verlust bzw. die Inhibition der pro-apoptotischen Funktion von p75NTR zu einer verminderten Ausweitung des sekundären Hirnschadens und zu abgemilderten neurologischen Konsequenzen führt.

Des Weiteren wird die Rolle von Sortilin, das als Co-Rezeptor für p75NTR fungiert und maßgeblich an der Bindung des Propeptidteils der Neurotrophine beteiligt sein soll am *knock-out* Modell überprüft (18, 19).

Im letzten Abschnitt dieser Arbeit soll die Rolle des p75NTR bei der Entstehung des neurotoxischen Effekts von Propofol untersucht werden. Propofol ist sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin ein häufig eingesetztes Sedativum und Narkosemittel, das aufgrund seiner günstigen pharmakokinetischen Eigenschaften besonders in der Pädiatrie aber auch in der Traumatologie verwendet wird (20, 21). Besonders im juvenilen Hirn, in dem der p75NTR noch vermehrt exprimiert wird, induzieren Anästhetika allerdings neuronalen Zelluntergang. Dieser konnte im Jungtier durch die Gabe des pharmakologischen Inhibitors trans-activator of transcription peptide 5 (TAT-Pep5) reduziert werden (22, 23). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Propofol infolge eines SHT unter Beachtung der Wahl des Zeitpunkts sowie der Dauer der Gabe auch im ausgereiften Gehirn neurotoxische Effekte hervorruft und die posttraumatische Expression des p75NTR verstärkt (24, 25). Im Rahmen meiner Doktorarbeit erörtere ich zuletzt die Frage, ob nach pharmakologischer Hemmung des p75NTR der neurotoxische Effekt von Propofol im adulten Gehirn gemindert ist.

Angeichts der Tatsache, dass bisher noch keine zufriedenstellende Therapiemöglichkeit, die neben der Erstversorgung auf eine Reduktion des Sekundärschadens abzielt, entwickelt werden konnte, ist die Rolle des p75NTR und dessen mögliche pharmakologische Beeinflussung von hoher Relevanz, um die individuellen und kollektiven Schäden, die jährlich durch SHT verursacht werden, zu verringern.

2. Literaturdiskussion

2.1. Das Gehirn

Das Gehirn bildet zusammen mit dem Rückenmark das zentrale Nervensystem (ZNS). Aus dem ZNS entspringen Nerven, die Muskeln, Organe, Blutgefäße und Drüsen innervieren und in ihrer Gesamtheit als peripheres Nervensystem bezeichnet werden (26). Das ZNS erhält Informationen aus den peripheren Gebieten, verarbeitet diese und schickt Befehle zu den Effektoren zurück (27).

2.1.1. Anatomie des Gehirns

Das Hirn kann onto- und phylogenetisch in fünf Hauptabschnitte untergliedert werden: das Rautenhirn (Rhombencephalon) bestehend aus Nachhirn (Myelencephalon) und Hinterhirn (Metencephalon), das Mittelhirn (Mesencephalon) sowie das Vorderhirn (Prosencephalon) mit dem Zwischenhirn (Diencephalon) und dem Endhirn (Telencephalon). Vereinfacht kann man das Gehirn allerdings auch in Großhirn (Cerebrum), Kleinhirn (Cerebellum) und Hirnstamm (Truncus encephali) einteilen.

In der hier vorliegenden Arbeit ist besonders das Großhirn von Bedeutung. Es unterteilt sich in zwei Hemisphären, die über Kommissuralfasern miteinander verbunden sind.

Die hauptsächlich aus Neuronen bestehende graue Substanz bildet sowohl die Großhirnrinde als auch tiefer gelegene Kerngebiete (Basalganglien). Die afferenten und efferenten Fasern der weißen Substanz formen das Großhirnmark (26, 28).

Von außen ist das Gehirn von der knöchernen Schädelkalotte umgeben. Diese ist durch das Tentorium cerebelli beim Tier in eine rostral gelegene große und eine caudal gelegene kleine Schädelhöhle getrennt und fungiert als guter Schutz gegenüber äußeren Einflüssen.

Zwischen Hirngewebe und Knochen befinden sich die Hirnhäute, Meningen genannt. Direkt der Oberfläche des Gehirns liegt die Pia mater an, zusammen mit der nach außen folgenden Arachnoidea wird sie als weiche Hirnhaut bezeichnet. Der Schädelkalotte zugewandt befindet sich die Dura mater, auch als harte Hirnhaut bezeichnet. Diese Strukturen erfüllen eine Stütz- und Versorgungsfunktion. In den Granulationes arachnoidales wird der Übertritt von Liquor ins Blut ermöglicht. Im Gegensatz zum weitestgehend schmerzunempfindlichen

Nervengewebe, sind die Meningen gut innerviert und demnach empfänglich für Schmerzreize.

Der Liquor cerebrospinalis (Hirnwasser) wird in den Plexus choroidei der vier Ventrikel gebildet und umfließt sowohl das Hirn als auch das Rückenmark, bietet einen mechanischen Schutz und dient als Ersatz für die fehlende Lymphflüssigkeit im ZNS (26).

2.1.2. Histologie des Gehirns

Histologisch können im ZNS zwei Strukturelemente unterschieden werden: Neurone und Gliazellen. Beide sind neuroektodermalen Ursprungs.

Das Neuron ist die am weitesten differenzierte Zelle. Es vermag Reizsignale zu empfangen, weiterzuleiten, zu verarbeiten und teilweise zu beantworten (Sinneszellen). Aufgrund dieser komplexen Spezialisierung sind die Nervenzellen jedoch nicht mehr in der Lage eigenen Stoffwechsel zur Aufrechterhaltung der Energiebilanz zu betreiben. Diese Funktion wird von den Gliazellen übernommen (29). Das Grundelement des Nervensystems, das Neuron, wird in einen Zellkörper (Perikaryon) und dessen Fortsätze (Axon und Dendriten) unterteilt. Das Perikaryon beherbergt die wesentlichen Zellorganellen und dient der Synthese vieler Stoffwechselprodukte, die über die Nervenfortsätze anschließend an ihren Zielort transportiert werden (28). Die Dendriten dienen dem Empfang von Erregungen (afferent) und leiten sie zum Perikaryon hin. Je nach Typ der Nervenzelle besitzt sie einen (unipolar) bis viele (multipolar) Dendriten. Als efferenten Reizleitungsteil entwickelt jedes Neuron nur ein Axon, das die Erregung in Form eines Aktionspotentials vom Zellkörper in die Peripherie leitet. Am Ende eines jeden Axons befindet sich eine Synapse, die aus einer prä- und einer postsynaptischen Membran besteht zwischen denen sich der präsynaptische Spalt befindet. Hier kommt es zur Übertragung von elektrischen oder chemischen Impulsen. Bei den chemischen Synapsen spielen insbesondere Neurotransmitter und deren Rezeptoren eine wichtige Rolle (29).

Die im ZNS vorkommenden Gliazellen können in vier verschiedene Arten unterteilt werden. Die Oligodendrozyten, die die Markscheiden um die Axone bilden; die Mikroglia, deren Hauptaufgabe die immunologische Abwehr und Aufräumfunktion ist; die Ependymzellen, denen die innere Auskleidung der Liquorräume obliegt und zuletzt die Astrozyten. Ihre Aufgabe ist neben der Stützfunktion die Ernährung und Regeneration der Neuronen. Nach Gewebeschädigung im Gehirn bilden sie die sogenannte Glianarbe (28).

2.1.3. Durch das experimentelle SHT beeinträchtigte Hirnanteile

2.1.3.1. Der Cortex

Der Cortex cerebri ist die nervenzellreiche äußere Schicht des Telencephalons. Makroskopisch fällt eine Furchung der Großhirnrinde auf, durch die sie sich in Gyri und Sulci unterteilen lässt. Histologisch werden grundsätzlich von außen nach innen folgende Schichten unterschieden: Molekularschicht - äußere Körnerschicht – äußere Pyramidenschicht – innere Körnerschicht – innere Pyramidenschicht – multiforme Schicht. Regional und tierart-spezifisch kann diese Anordnung erhebliche Unterschiede aufweisen.

Die Großhirnrinde wird zudem beim Säugetier in vier Lappen unterteilt: der Lobus frontalis, der durch das Vorherrschen motorischer Areale gekennzeichnet ist, der Lobus parietalis mit hauptsächlich somatosensorischen Gebieten sowie der Lobus temporalis, der die Hörrinde und der Lobus occipitalis, der die Sehrinde beherbergt (26). Der Frontallappen kann in weitere Bereiche unterteilt werden. Von Bedeutung sind hier insbesondere der primäre motorische als auch der primäre somatosensorische Cortex. Aus ersterem entspringt die für die Lokomotion wichtige Pyramidenbahn (27). Jedes Körperorgan sowie auch die Muskulatur haben Projektionsfelder auf der Großhirnrinde, die für viele Tiere (unter anderem die Maus) als auch für den Menschen genau charakterisiert sind (30).

2.1.3.2. Der Hippocampus

Der Hippocampus ist paarig angelegt, befindet sich an der ventro-medialen Seite der lateralen Ventrikel und gehört dem dreischichtigen Archicortex an. Er kann untergliedert werden in Gyrus dentatus, Ammonshorn (Cornu ammonis) und Subiculum. In dieser Reihenfolge erfolgt auch die Erregungsweiterleitung. Das Ammonshorn kann zusätzlich in vier Bereiche unterteilt werden: CA1-CA4.

Die Hauptfunktion des Hippocampus besteht in der Gedächtnisbildung. Zusätzlich trägt er als Teil des limbischen Systems zur emotionalen, viszeralen und endokrinen Verarbeitung bei (28).

Eine Besonderheit des Hippocampus ist, dass er zur Neurogenese fähig ist (31). Beeinträchtigungen des Hippocampus werden mit Krankheitsbildern wie Epilepsie, Schizophrenie oder Alzheimer in Verbindung gebracht (32-34).

2.1.4 Tierartliche Unterschiede

Hauptunterschied des Gehirns zwischen verschiedenen Tierarten und auch in Vergleich zu dem des Menschen liegt neben der Größe in dessen Aufbau und Zelldichte.

Während häufig in Tierversuchen eingesetzte Nagetiere wie Maus und Ratte ein lissencephales Hirn aufweisen, besitzen höher entwickelte Säugetiere wie Schwein, Hund und Katze sowie Primaten und der Mensch ein gyrencephales Gehirn. Die Großhirnrinde von Nagern weist eine glatte, ungefurchte Oberfläche auf wohingegen die der letztgenannten Gruppe eine starke Furchung zeigt. Die Anzahl der Gyri und Sulci steigt hier mit der Entwicklungsstufe.

Ein weiterer Unterscheidungspunkt zwischen den meisten Säugetieren und aufrechtgehenden Arten, wie Primaten und dem Mensch, ist die Ausrichtung der Neuraxis. Während sie in der erstgenannten Gruppe linear angeordnet ist, erfolgte in der Entwicklung über den Affen zum Menschen ein Abknicken dieser Achse auf Höhe des Diencephalons, sodass das Kleinhirn, der Hirnstamm und das Rückenmark nun im 90°-Winkel nach ventral verlagert sind (35).

Auch die Anzahl der Neurone variiert stark zwischen den Spezies. Während ein Maushirn im Mittel 0,416 Gramm (g) wiegt und dabei 71 Millionen Neurone besitzt, wiegt ein menschliches Hirn im Mittel 1508 g bei einer Anzahl von 86.000 Millionen. Der Cortex-Anteil an der Gesamtmasse des Hirns variiert zudem von 42 % bei der Maus bis zu 82 % beim Menschen (36, 37).

2.2. Das Schädel-Hirn-Trauma

2.2.1. Pathophysiologie des SHT

Die Pathophysiologie des SHT kann in zwei Phasen unterteilt werden. Den akuten primären Insult und die daraufhin einsetzende sekundäre Schadensentwicklung.

Die primäre Verletzung ist bedingt durch direkte oder indirekte Gewalteinwirkung. Dies kann die Folge eines Sturzes oder eines Zusammenpralls mit starren oder beweglichen Gegenständen sein oder durch das Einwirken Dritter geschehen, die mit spitzen oder stumpfen Materialien beziehungsweise (bzw.) mit Hilfe von Schusswaffen direkte Gewalt auf den Kopf ausüben (38, 39).

Grundsätzlich kann zwischen einem geschlossenen und einem offenen SHT unterschieden werden. Bei Ersterem ist die Dura mater noch intakt wohingegen sie beim Letztgenannten infolge eines spitzen oder stumpfen Traumas beschädigt ist und somit eine direkte Verbindung zwischen Hirngewebe und Umwelt besteht (15).

Der Primärschaden ist gekennzeichnet durch einen Gewebsuntergang, der durch Scher-, Torsions- oder Kontusionskräfte hervorgerufen wird (40). Während der frakturierte Schädelknochen chirurgisch versorgt werden kann, ist der neuronale Verlust irreversibel. In Zusammenhang mit dem primären Insult steht auch die Ausbildung von epiduralen, subduralen oder subarachnoidalen Blutungen (41).

In den folgenden Minuten, Stunden (h), Tagen (d), Wochen bis hin zu Monaten erfolgt die Ausbildung des Sekundärschadens (42). Gekennzeichnet ist das durch einen verstärkten intrazerebralen Druck mit darauffolgender Minderperfusion des Hirnparenchyms und Ödembildung (43, 44). Der Grund für die erhöhte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke liegt zum einen in einer Beeinträchtigung der zerebro-vaskulären Autoregulation, zum anderen in der Schädigung der zerebralen Gefäße aufgrund der Auswirkungen des primären als auch des sekundären Schadens (45, 46). Zuletzt trägt auch die posttraumatische Exzitotoxizität zur Destabilisierung der Blut-Hirn-Schranke bei. Übermäßige Glutamat-Ausschüttung und die Aktivierung der korrespondierenden Rezeptoren führen hierbei zu vermehrtem Kalzium-Einstrom in die Zelle. Dies löst wiederum Signalkaskaden aus, die zum Abbau von Zell-Zell-Verbindungen und zum Zelltod führen (47, 48). Der intrakranielle Druck wird vom Gleichgewicht folgender drei Komponenten bedingt: Hirnparenchym, Blut und Liquor. Da bei einem geschlossenen SHT die rigide Schädelkalotte ein weiteres Ausdehnen verhindert, sterben als Resultat dieser Druckerhöhung weitere Areale aufgrund von

Minderperfusion und Kolliquationsnekrose ab (49). Die Initialtherapie zielt daher auf die Verminderung des zerebralen Drucks und die Steigerung der Reperfusion ab (14). Als weitere Ursachen, die der sekundären Schadensvergrößerung zuträglich sind, gelten oxidativer Stress (50) sowie metabolische Dysfunktion (51). Eine starke Immunreaktion (52) sowie eine neurofunktionelle Imbalanz zugunsten von exzitatorischen Signalwegen (53) führen zu gesteigertem Zelltod durch nekrotische und apoptotische Signalkaskaden.

Abb. 1 zeigt die Entwicklung des Sekundärschadens innerhalb der ersten drei Tage nach dem Schaden anhand von Tetrazoliumchlorid-gefärbten Schnitten. Die roten Areale kennzeichnen vitales Gewebe, der graue Bereich zeigt geschädigtes Parenchym an (54).

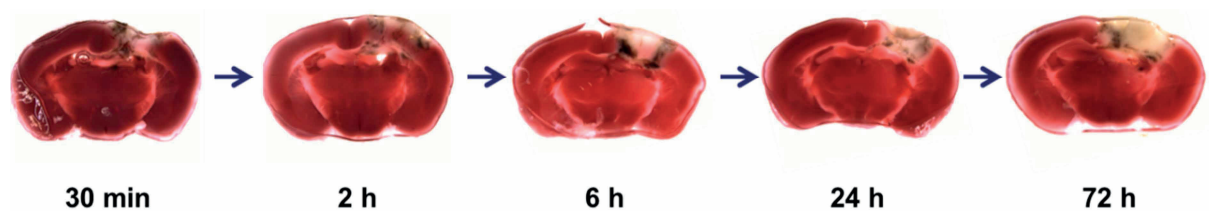


Abbildung 1: Entwicklung des Sekundärschadens (modifiziert nach Yang (54))

Während der primäre Schaden nur indirekt durch Präventivmaßnahmen wie dem Tragen eines Helms und besondere Vorsichtsvorkehrungen zu beeinflussen ist, steht die Vermeidung bzw. Verminderung des Sekundärschadens im Fokus jedes Therapieversuchs (55, 56).

2.2.2. SHT beim Menschen

Zur Epidemiologie des SHT gibt es weltweit verschiedene Studien: Für ein Review wurden Studien aus 23 europäischen Ländern (darunter auch Deutschland) aus den Jahren 1980-2003 analysiert und eine Inzidenz von 235 pro 100.000 Einwohner und eine Mortalität von 15 / 100.000 kalkuliert (57). Eine Übersichtsstudie aus Deutschland gibt 332 Fälle / 100.000 Einwohner bei einer Mortalität von 1 % an. Stürze (52 %) und Verkehrsunfälle (26,3 %) führen demnach am häufigsten zu SHT und sind oftmals vergesellschaftet mit Verletzungen des Gesichtsschädels (58,7 %), der Extremitäten (19,3 %) oder der Wirbelsäule (8,8 %). Männer (60 %) sind grundsätzlich öfter betroffen als Frauen (40 %) (58). In Amerika liegt die jährliche Inzidenz bei 579 Fällen / 100.000 Einwohner (59). In den Jahren 1997-2007 starben in Amerika jährlich ca. 53.000 Menschen an den Folgen eines SHT. Männer sind hiervon 3-mal häufiger betroffen als Frauen. Als Hauptursache gelten Schusswaffenverletzungen (34,8 %) und Verkehrsunfälle (31,4 %) gefolgt von Stürzen (16,7 %) (38). Die häufigste Form

des SHT in Australien stellen subdurale Hämorrhagien dar (42,9 %), gefolgt von Gehirnerschütterungen (24,1 %) und subarachnoidalen Blutungen (17,7 %) (60).

Die Einschätzung des Schweregrades erfolgt mit Hilfe des Glasgow Coma Scale (GCS). Die Patienten werden in drei Kategorien (Augenöffnung, verbale Kommunikation, motorische Reaktion) getestet und jeweils mit maximal (max.) sechs Punkten bewertet, sodass eine Endpunktzahl von höchstens 15 erreicht werden kann, die auf volles Bewusstsein und uneingeschränkte neurologische Funktion schließen lässt (61). Ab einem Score unter neun ist es empfohlen zu intubieren, um die Ventilation aufrecht zu erhalten. Für Kleinkinder, die sich noch nicht artikulieren können, gibt es eine angepasste pädiatrische Variante des GCS (62). In Zusammenhang mit dem GCS kann bei SHT bedingten dekomprimierenden Kraniektomien der Rotterdam Computer Tomography (CT) Score zur Prognostik angewandt werden (63). Die Marshall CT Klassifikation ist ein weiteres prognostisches Verfahren, das jedoch zur besseren Anwendbarkeit durch individuelle CT-Charakteristika ergänzt werden sollte (64). Bezüglich des Schweregrades werden über 90 % aller Fälle als mild eingestuft (57, 58, 65).

Auch der sozioökonomische Faktor des Krankheitsbildes sollte nicht vergessen werden, da neben den direkten Kosten für Behandlung und Rehabilitation auch indirekte Kosten aufgrund zeitlich begrenzter oder totaler Arbeitsunfähigkeit entstehen (66). Beeinflusst wird die Höhe der Kosten sowohl durch Verletzungs-abhängige als auch durch demographische Parameter. Verlängerte posttraumatische Amnesie, abnormale CT-Befunde oder Epilepsie erhöhen die Kosten genauso wie ein Wohnsitz außerhalb von Städten, Arbeitslosigkeit vor dem Trauma und geringere Bildung. Die Behandlung von alten Menschen, die zusätzlich meist schon Vorerkrankungen haben und Menschen, die vor dem SHT bereits in psychiatrischer Behandlung waren ist auch teurer (3). Für Europa belaufen sich die jährlichen Ausgaben auf 33 Milliarden Euro (67). In Neuseeland werden 47,9 Millionen amerikanische Dollar für die Behandlung im ersten Jahr nach SHT ausgegeben (65). Eine Studie aus Holland gibt eine Belastung von 314,6 Millionen Euro / Jahr an. Insbesondere bei Männern sind die indirekten Kosten hier höher als bei Frauen, sodass die totalen Kosten bei männlichen Patienten 19.540 Euro pro Fall und bei weiblichen Patienten 14.940 Euro pro Fall betragen. Zusätzlich werden durchschnittliche 7,1 Jahre pro SHT-Fall angegeben, in denen die Person durch Behinderungen infolge der Krankheit beeinträchtigt ist (68). In der Regel kehren die meisten Patienten 3-6 Monate nach der Behandlung in die Erwerbstätigkeit zurück (69).

Das SHT kann eine Reihe von Folgeerkrankungen bedingen, die sich über ein langes Zeitintervall ausstrecken können. 10 Jahre nach dem eigentlichen Vorfall klagen noch 37,2 % über generelle Gesundheitsprobleme wie Erschöpfung und Schlaflosigkeit und stufen ihre Lebensqualität als schlechter ein (70). Des Weiteren weisen nach dieser Zeit noch 44 % eine moderate Behinderung auf und 31 % leiden an Depression (71). Als Langzeitauswirkung des SHT werden neben einer Beeinträchtigung des Lernverhaltens (72) Epilepsie (71, 73), Parkinson (74) und Demenz (75) beschrieben.

2.2.3. SHT beim Tier

2.2.3.1. Das Tier als Patient

Das SHT ist auch ein weit verbreitetes Krankheitsbild im veterinärmedizinischen Patientengut, auch wenn genaue Inzidenzzahlen hier rar sind. In einer großen multizentrischen Studie mit 1099 Hunden und 191 Katzen, die infolge einer traumatischen Verletzung vorgestellt wurden, zeigten 42 % der Hunde und 26 % der Katzen klinische Anzeichen einer traumatischen Hirnverletzung auf (76). Diese Zahlen werden unterstützt durch einen beschriebenen Anteil von 25 % an caninen Patienten, deren Vorstellungsgrund mit stumpfem Trauma angegeben ist (77). In einer anderen Studie, bei der die Fälle alle aus einer großen Klinik rekrutiert wurden, konnte bei 290 Hunden in den Jahren 1997-1999 eine traumatische Hirnverletzung konstatiert werden (4). Als häufigste Ursache werden bei Hunden Autounfälle und bei Katzen ein Fall aus großer Höhe angegeben. Daneben führen Zusammenstöße, Bisswunden, Schussverletzungen sowie ungewollte oder beabsichtigte Verletzung direkt durch den Menschen zu neurologischen Traumata, die auch Verletzungen der Wirbelsäule beinhalten (39, 56).

Bei Pferden ist der Grund meist ein frontaler Zusammenstoß mit starren oder beweglichen Objekten aufgrund von Fluchtverhalten oder Stürzen. Auch Trittverletzungen im Rahmen von Rangkämpfen können zur Ausbildung eines SHT führen (78, 79).

Die Angaben zur Mortalität schwanken stark. Dies ist wie in der Humanmedizin auch in der Veterinärmedizin stark mit der Tatsache verknüpft, dass die Patienten besonders infolge von Unfällen oft weitere Verletzungen haben, die die Sterblichkeit beeinflussen (80). Feary et al. postulieren zum Beispiel (z.B.) für das Auftreten von zusätzlichen Schädelbasisfrakturen beim Pferd einen schlechteren Ausgang (81).

Therapeutisch steht neben der Behandlung eines etwaigen Schocks an erster Stelle die Korrektur von Hypovolämie und Hypoxie durch Volumen- und Sauerstoffzufuhr, da beides den Anstieg des intrakraniellen Druckes (ICP) begünstigt (82). Das Hauptaugenmerk liegt auf der Verringerung des ICP. Dies wird vornehmlich durch die Gabe von hyperosmotischen Flüssigkeiten erreicht. Dazu werden 0,25-0,5 g / Kilogramm (kg) 10 %-iges Mannitol über 30 Minuten (min) infundiert (83). Da Hyperglykämie in Hunden und Katzen häufig in Verbindung mit SHT auftritt und dabei mit der Stärke des Traumas korreliert (4), sollte der Blutzucker kontrolliert werden. Überdies wird in der Literatur ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Krampfanfällen und SHT für Hunde (84, 85) und Katzen (86) beschrieben, was mit Hilfe von Phenobarbital oder Hypothermie (87) behandelt werden kann. Das Therapiekonzept sollte durch Anti-Inflammation, Analgesie, gastrointestinale Prophylaxe, unterstützender Ernährung und Physiotherapie abgerundet werden (56).

Als prognostisches Mittel findet das Modell des modifizierten GCS (MGCS) auch in der Veterinärmedizin Anwendung (Tab. 1). Die Tiere werden neurologisch in drei Kategorien (Bewusstseinslevel, motorische Aktivität und Hirnstamm-Reflexe) untersucht wobei pro Kategorie jeweils 1-6 Punkte verteilt werden. Insgesamt können die Patienten eine Maximalpunktzahl von 3-18 Punkten erreichen. Je höher der Score desto besser die Prognose.

Tabelle 1: MGCS (modifiziert nach Platt(88))

MGCS Kategorie	MGCS Punkte	Prognose
I	1-6	schlecht
II	7-12	vorsichtig
III	13-18	gut

Insbesondere in den ersten 48 h nach Trauma konnte eine lineare Korrelation zwischen diesen beiden Parametern festgestellt werden (88). Sande und West sprechen sich dafür aus, den MGCS eher zur objektiven Betrachtung des neurologischen Verlaufs heranzuziehen als ihn als ultimates prognostisches Mittel einzusetzen (39).

2.2.3.2. Das Tier als Versuchstier

Versuche an Menschen können aus ethisch-moralischen Gründen nicht durchgeführt werden. In der klinischen Forschung beruht der Erkenntnisgewinn in den Feldern traumatische Hirnverletzung und Neurotoxizität von Anästhetika demnach meist auf retrospektiven Analysen. Insbesondere das Fehlen von Kontrollgruppen reduziert die Aussagekraft der meisten Studien. Aus ethischen Gründen ist es jedoch schwer vertretbar einem Teil des Patientenguts mit SHT keine Therapie zukommen zu lassen oder gesunden Menschen Anästhetika zu Vergleichszwecken zu applizieren.

Eine zentrale Rolle spielen Tiere daher als Modellorganismen für SHT-Experimente. Den Regeln des Speziesismus folgend, ist dies für die meisten Menschen ethisch vertretbar. Tiere kommen einerseits in *in vivo* Experimenten direkt zum Einsatz, andererseits sind zudem die meisten Zellen und organspezifisches Gewebe für *in vitro* Studien tierischen Ursprungs. Die Vorteile von Tierversuchen sind neben der erwähnten verbesserten Möglichkeit Kontrollgruppen einzusetzen, die hohe Reproduzierbarkeit und die damit einhergehende Vergleichbarkeit. Während *in vitro* Studien häufig die zugrundeliegenden Mechanismen von Trauma und Anästhetika-Wirkung untersuchen, können in *in vivo* Versuchen viele verschiedene Parameter untersucht und somit besonders die Auswirkungen auf den gesamten Organismus erforscht werden.

Mit Abstand am häufigsten werden Mäuse und Ratten zu Versuchszwecken herangezogen. 2013 gehörten 87 % aller in Deutschland eingesetzten Versuchstiere zu einer der beiden Arten. Insgesamt kamen dabei 2.199.671 Mäuse und 375.656 Ratten zum Einsatz (89). Neben ihrer hohen Reproduktionsrate und dem geringen Platz- und Kostenverbrauch für die Haltung und Unterbringung der Tiere, spricht für diese Nagetiere die Tatsache, dass viele der heutzutage gängigen SHT-Modelle für die genannten Organismen etabliert sind (5, 15). Ein weiterer sehr wichtiger Punkt ist, dass man mit Hilfe von genetischen Manipulationen das Erbgut von Mäusen (und in geringem Maße von Ratten) so verändern kann, dass bestimmte Proteine in den Tieren nicht ausgebildet werden (*knock-out*), überexprimiert werden (*over-expresser*) oder humane Proteine von den Tieren ausgebildet werden (*transgen*).

Die Tauglichkeit in Hinblick auf die Translationalität variieren zwischen den unterschiedlichen Spezies. Die lissenzepale Struktur des Nagerhirns führt im Vergleich zum gyrencephalen Hirn höher entwickelter Säuger und des Menschen zu verminderter Deformation nach SHT. In Größe und Funktion weist jedoch das Schwein insbesondere für pädiatrische SHT-Modelle das geeignetste Gehirn auf. Neben einem vergleichbaren

perinatalen „brain growth spurt“ sind die entwicklungsbedingten Veränderungen bezüglich der Myelinisierung und des Hirn-Wasser-Gehalts dem menschlichen Hirn während der Entwicklung am Ähnlichsten (90).

2.2.4. SHT-Modelle

2.2.3.1. *Controlled Cortical Impact*

Das Modell des *controlled cortical impact* (CCI) ist eins der am weitesten verbreiteten SHT-Modelle und wurde auch in den hier vorliegenden Studien angewendet. Die genaue Durchführung ist unter 4.5. detailliert beschrieben und verursacht eine fokale Kontusion, die mit einem diffusen axonalen Schaden einhergeht.

Erstmalig wurde das Modell, bei dem es durch einen pneumatischen Impact auf die intakte Dura mater zum Trauma kommt, 1988 für das Frettchen etabliert (91). Im Jahr 1991 modifizierte man es für die Ratte (92). In beiden Studien untersuchte man zudem den Einfluss von Aufprallgeschwindigkeit und Durchmesser des Impaktors auf den entstehenden Schaden, der einem klinischen “closed-head” Trauma entspricht und fand einen linearen Zusammenhang heraus. Die Spannweite der Auswirkungen reichte histologisch von keinem Schaden bis hin zu starker kortikaler Kontusion einhergehend mit umfangreichem Zelluntergang und intraparenchymalen Hämorrhagien. Systemisch kommt es nach moderatem Schaden zu hypotensiven Zuständen, wohingegen hohe Geschwindigkeit und großer Impact zu hypertensiven Peaks gefolgt von starker Hypotension führten und oft fatal enden. Im Jahr 1995 wurde das Verfahren an die Maus adaptiert (93) und mit Hilfe verschiedener histologischer Färbungen ein Ausmaß des Schadens postuliert, das in bestimmten Bereichen auch die kontralaterale Seite betrifft. Zudem konnte eine Beeinträchtigung der operierten Tiere in Verhaltenstests wie dem Morris-Water-Maze-Test gezeigt werden.

Der Vorteil des Modells ist die gute Steuerbarkeit der variablen Aufprallgeschwindigkeit und –dauer, der Eindringtiefe sowie des Durchmessers des Impaktors. Während Smith et al. noch eine Aufprallgeschwindigkeit von 5,7-6,2 Meter/Sekunde (m/s) einsetzte, werden heute bereits Geschwindigkeiten von bis zu 8 m/s erzeugt (94, 95).

Eine neuartige Methode benutzt anstatt des pneumatischen Antriebs einen elektromagnetischen. Hierbei bedarf es allerdings einer größeren Eindringtiefe, um einen dem herkömmlichen CCI vergleichbaren Schaden zu induzieren (96).

2.2.3.2. Fluid Percussion Injury Modell

Neben dem CCI ist das *fluid percussion injury* Modell (FPI) das am häufigsten eingesetzte Verfahren zur Erzeugung eines experimentellen SHT (97, 98). Hierbei wird nach einer Kraniotomie, die der Größe des Kolbens entspricht, der auf die intakte Dura mater aufgesetzt wird, die Kraft eines schwingenden Pendels über eine Flüssigkeitssäule (isotonische Kochsalzlösung) auf das Gehirn übertragen, wobei die Flüssigkeit ins Hirn injiziert wird (Abb. 2). Hieraus resultiert ein diffuser Schaden der vornehmlich in einer Erhöhung des ICP und Hämorrhagien resultiert. Ursprünglich wurde das Modell 1987 für die Katze (99) entwickelt, kurz darauf (1987) auf die Ratte (100) und zuletzt 1998 auf die Maus übertragen (101). Neben der Kraft des Pendels kann auch der Aufsatzpunkt des Kolbens variiert werden. So kann zwischen dem sagitalen (100), parasagitalen (102) und lateralen FPI (100) unterschieden werden. Die Varianten unterscheiden sich unter anderem in der unterschiedlichen Beeinträchtigung des Hirnstamms und der kontralateralen Hemisphäre.

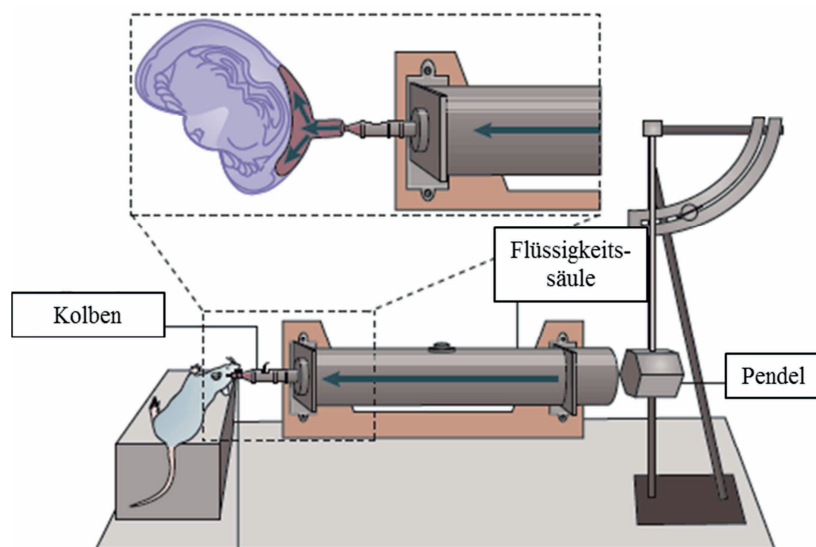


Abbildung 2: Fluid-Percussion-Modell (modifiziert nach Xiong (5))

2.2.3.3. Weitere SHT-Modelle

Weniger verbreitete Modelle zur Induktion eines SHT stellen das Weight-Drop- und das Kälteläsions-Modell dar.

Beim Weight-Drop-Modell wird ein Gewicht auf den Schädel des Versuchstiers herabfallen gelassen und somit ein diffuses Trauma erzeugt. Die 1981 von Feeney et al. entwickelte Variante kennzeichnet sich durch eine vorangegangene Kraniotomie (103), wohingegen die von Shapira et al. 1988 beschriebene Variante bei geschlossener Schädelkalotte durchgeführt

wird (104). Im Jahr 2009 wurde das Modell auf die Maus übertragen (105). Vorteilhaft sind die kurze Zeit, die die Prozedur in Anspruch nimmt (ohne Kraniotomie) und die Möglichkeit durch Variation der Fallhöhe sowie des Gewichts Traumata von unterschiedlicher Stärke zu erzeugen. Kontrovers wird allerdings die Vergleichbarkeit aufgrund mangelnder Reproduzierbarkeit diskutiert (5).

Das Kälteläsions-Modell ist ein Beispiel für ein experimentelles SHT, das einen stark fokal begrenzten Schaden produziert und die von den hier beschriebenen Modellen geringste Beeinträchtigung des übrigen Hirngewebes sowie kaum systemische Auswirkungen hat (106). Aus diesen Gründen ist es dem klinischen SHT nicht sehr nahe. Zur Induktion wird nach Trepanation des knöchernen Schädels ein stark gekühlter Kupferzylinder in das Hirngewebe eingeführt. Verweildauer, Größe und Platzierung des Zylinders führen zu Variationen der Schadensentwicklung (107).

2.2.3.4. SHT-Modelle am Großtier

Besonders das Schwein findet aus unter 2.2.3. erläuterten Grund des Öfteren Anwendung als Modelltier für experimentelles SHT z.B. beim FPI (108). Neonatale Ferkel werden als Modell für pädiatrisches SHT eingesetzt (109). Ein weiteres Feld in dem SHT-Modelle am Großtier zum Einsatz kommen, ist die Erforschung von Schussverletzungen. Zum einen ist dies, besonders in Amerika (38), eine der häufigsten Ursachen für SHT beim Menschen zum anderen ist es das Mittel der Wahl zur Betäubung von Schlachttieren und ist somit auch aus Tierschutzgründen relevant (110, 111). Hierbei unterscheidet man hauptsächlich zwischen einer penetrierenden und einer nicht-penetrierenden Variante. Als Tiere eignen sich hierfür Rinder, Schafe und Schweine (111-114). Die Übertragbarkeit auf den Menschen ist allerdings auch hier mit Schwierigkeiten verbunden (115).

2.3. Neurotrophine und Neurotrophinrezeptoren

2.3.1. Neurotrophine

Zur Familie der Neurotrophine gehören der zuerst und am besten charakterisierte *nerve growth factor* (NGF), der *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), sowie die Neurotrophine (NT) 3 und 4/5 (116). Innerhalb der Klasse der Wirbeltiere sind alle vier Vertreter in ihrem Aufbau hoch konserviert. NT-4/5 findet man allerdings nicht in Vögeln (117) wohingegen Fische als einzige Spezies NT-6 und NT-7 exprimieren (118, 119).

Neurotrophine werden als Prä-Pro-Neurotrophine im neuronalen Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Nach der Abspaltung des Signalpeptids entstehen Pro-Neurotrophine, die im trans-Golgi Apparat akkumulieren (120). Die Umwandlungen zu maturen Neurotrophinen erfolgt dort nach katalytischer Spaltung durch Furin und die Proprotein Konvertasen 1 und 2 (PCSK 1 und 2). Eine andere Variante beinhaltet die Sekretion der Pro-Neurotrophine in den synaptischen Spalt, wo der Propeptidteil enzymatisch von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) (121) oder Plasmin abgespalten wird. Zuvor katalysiert sezernierter *tissue plasminogen activator* (tPA) die Spaltung von Plasminogen zu Plasmin (122).

Sowohl die Pro- als auch die mature Form der Neurotrophine liegen als Homodimere vor und werden in sekretorischen Vesikeln gespeichert, in denen sie auch zu prä- und postsynaptischen Membranen transportiert werden (123).

2.3.1.1. Funktionsweise

Durch die Bindung von Neurotrophinen an ihre korrespondierenden Rezeptoren werden unterschiedliche Signalkaskaden ausgelöst, die das neuronale Überleben, die Synaptogenese, das Auswachsen von Axonen und Dendriten, die synaptische Plastizität sowie Proliferation und Apoptose von Neuronen beeinflussen und steuern (124, 125).

Neurotrophine vermitteln ihre vielfältigen Wirkungen über zwei verschiedene Arten von Rezeptoren: Tyrosin Kinase Rezeptoren (Trk) und p75NTR. Beide befinden sich auf der Zelloberfläche und weisen keine strukturellen Gemeinsamkeiten auf (116). Während NGF, BDNF, NT-3 und NT-4/5 mit der gleichen niedrigen Affinität an den p75NTR binden, weisen sie ein spezifisches Bindungsverhalten zu den Trk-Rezeptoren auf (s. 2.3.2.2), an die sie mit gesteigerter Affinität binden.

Das stöchiometrische Verhältnis ist bisher nicht abschließend geklärt. Während einige Autoren ein 2:2 Verhältnis zwischen NGF oder NT-3 mit p75NTR annehmen (126), gehen andere davon aus, dass ein homodimerisiertes NGF-Molekül an nur ein p75NTR-Molekül bindet (2:1) (127). Bei der Verbindung von Neurotrophinen mit Trk-Rezeptoren wird mehrheitlich von einem 2:2 Verhältnis ausgegangen, das durch eine Liganden-abhängige Dimerisierung der Rezeptoren bedingt ist (123). Eine Besonderheit besteht in der Tatsache, dass sich beide Rezeptoren nach Liganden-Bindung zu einem hoch-affinen Komplex zusammenschließen, durch den ausschließlich die neurotrophe Funktion begünstigt wird (128).

In Abb. 3 ist vereinfacht die ambivalente Wirkungsweise von Neurotrophinen und ihren Pro-Formen dargestellt. Die maturen Neurotrophine binden vornehmlich an Trk-Rezeptoren oder an Komplexe aus Trk-Rezeptoren und p75NTR und fördern das Zellwachstum und die Differenzierung besonders in neuronalem Gewebe. Im Gegensatz dazu führt die Bindung ihrer unprozessierten Pro-Form an p75NTR oder an einen Komplex von p75NTR und dessen Co-Rezeptor Sortilin zum apoptotischen Zelltod. Auf die ausgelösten Signalkaskaden wird in den folgenden Kapiteln detailliert eingegangen.

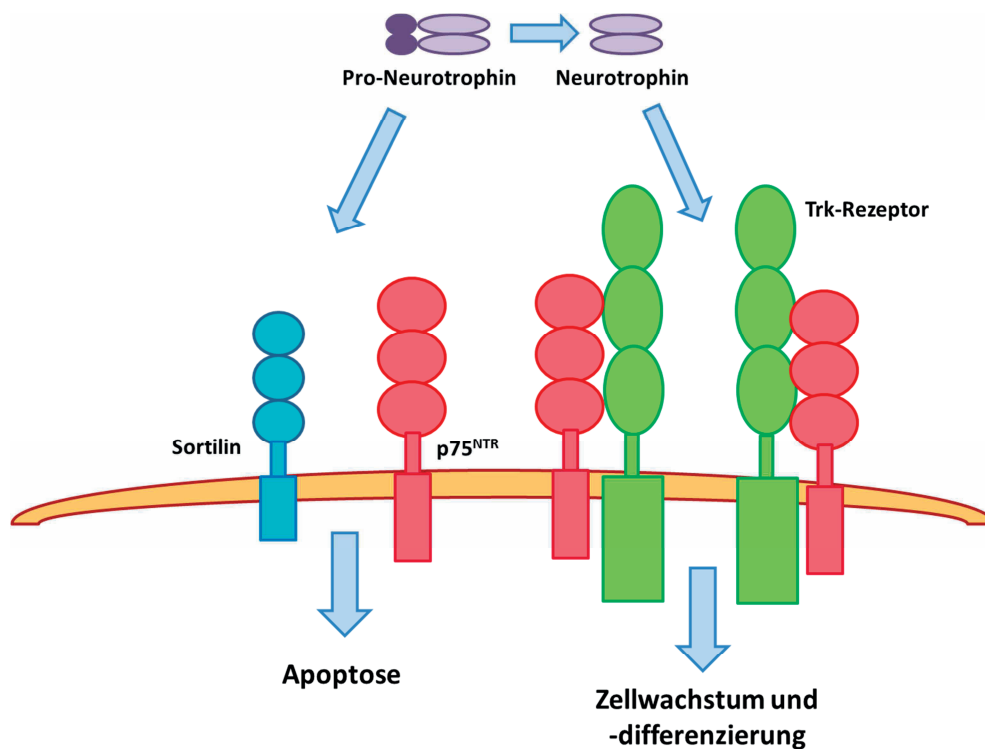


Abbildung 3: Wirkungsweise von Neurotrophinen (modifiziert nach Nykjaer (19))

2.3.1.2. Regulation nach SHT

Nach experimentellem SHT kommt es zu einer Dysregulation der Neurotrophin-Expression. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Expressionsregulation von NGF und BDNF im geschädigten Cortexareal über einen Zeitraum von einer Woche nach Trauma starken Schwankungen unterliegt (s. Abb. 4).

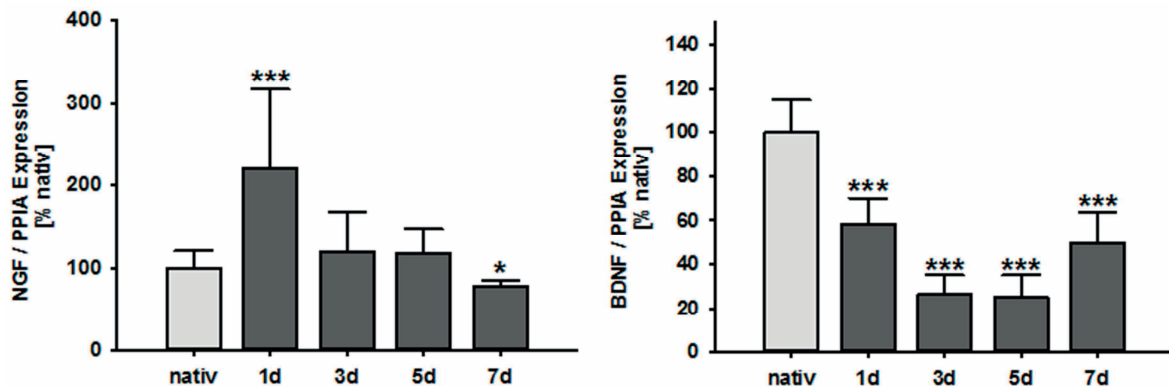


Abbildung 4: Neurotrophin mRNA-Expression (94)

Andere Arbeitsgruppen zeigen, dass die Veränderung in der Ausbildung von Neurotrophinen und ihren Rezeptoren sogar über mehrere Wochen persistiert und auch die kontralaterale Seite betrifft (129). Besonders die Pro-Form von NGF wird vermehrt nach zerebralen Insulten wie Axotomie, Ischämie und auch Epilepsie sezerniert und induziert Apoptose über die Bindung an p75NTR *in vitro* und *in vivo* (8, 130, 131). Auch in neurodegenerativen Krankheitsbildern wie z.B. Alzheimer dominiert die Pro-Form von NGF (132, 133).

2.3.2 Neurotrophinrezeptoren

2.3.2.1 p75 Neurotrophinrezeptor

Im Mittelpunkt der hier vorliegenden Arbeit steht der p75NTR in seiner Funktion als Zelltod vermittelnder Rezeptor, der insbesondere nach traumatisch bedingten Hirnverletzungen hochreguliert ist und eine zentrale Rolle bei der Auslösung apoptotischer Signalkaskaden einnimmt, die zur Vergrößerung des Sekundärschadens führen (94).

2.3.2.1.1. Charakteristika

Der p75NTR wurde als erster Rezeptor für NGF (NGFR) beschrieben und charakterisiert. Da er die Bindung zu dem Neurotrophin mit geringerer Affinität als Trk-Rezeptoren eingeht, wird er auch als low affinity NGFR beschrieben (134). Grundsätzlich bindet p75NTR alle vier Neurotrophine mit vergleichbarer Affinität (116).

Innerhalb der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor-Superfamilie nimmt er als transmembranöses Protein vom Typ 1 mit einem Molekulargewicht von 75 Kilodalton (kDa) eine Sonderrolle ein. Gemeinsam mit den anderen Vertretern dieser Familie sind ihm die vier Cystein-reichen Domänen des extrazellulären Anteils, bei denen besonders die 3. Domäne als Bindungsstelle für die Liganden fungiert (135, 136). Eine kurze stalk-Region schließt sich basal an. Die einzelne kurze transmembranöse Domäne, die innerhalb der verschiedenen Spezies hochkonserviert ist, verbindet den extrazellulären mit dem intrazellulären Part des Rezeptors (16). Eine Besonderheit der intrazellulären Domäne (p75ICD) ist die 80 Aminosäuren große Typ 2 death domain (DD), die zwar keine intrinsische katalytische Fähigkeit besitzt, aber für die Bindung von Effektormolekülen zuständig ist (137).

Aus der Spaltung von p75ICD durch α -Sekretase resultiert ein Carboxylterminalfragment (p75CTF), das wiederum durch γ -Sekretase in ein 29 Aminosäuren großes lösliches ICD-Fragment gespalten wird, das anschließend frei im Zytoplasma vorliegt und als „Chopper Domain“ bezeichnet wird (138, 139).

2.3.2.1.2. Funktion

P75NTR fungiert als ambivalenter Rezeptor. Im Fokus dieser Arbeit steht seine Funktion als Auslöser des programmierten Zelltods, allerdings kann er vor allem im Zusammenspiel mit den Trk-Rezeptoren auch das Wachstum und die Differenzierung von Zellen begünstigen (140, 141).

Während der Embryogenese ist der p75NTR besonders auf Neuronen vermehrt exprimiert und hauptverantwortlich für den strukturierten Aufbau des Nervengeflechts des ZNS sowie für die zielgerichtete Innervierung von Zielorganen. Beweisend für Ersteres ist, dass Mäuse, denen ein funktionierender p75NTR fehlt, eine erhöhte Zahl von cholinergen Neuronen aufweisen (142). Zudem trägt p75NTR zum axonalen Wachstum und zur Ramifizierung von Dendriten bei (143) und fördert überdies die Migration von Schwannzellen (9). Für die zielgerichtete Innervierung von Zielorganen wurde ein Modell entwickelt, das auf „Bestrafung“ und „Belohnung“ durch Neurotrophine und deren Pro-Formen basiert. So sezernieren beispielsweise Muskelfasern proBDNF, welches an den p75NTR eines innervierenden Motoneurons bindet und zu dessen Retraktion führt. Über elektrische Impulse stimulierte Nervenfasern setzen jedoch MMP frei und fördern somit die Umwandlung des proBDNF zu maturem BDNF, was letztendlich über die Bindung an Trk B zur Extension dieser einzelnen Nervenfasern führt (144, 145).

Im adulten Hirn ist der Rezeptor nur noch in geringer Zahl ausgebildet. Nach zerebralen Insulten wie Ischämie (131), Epilepsie (11, 146), Axotomie (147), Rückenmarksverletzungen (148) sowie SHT (94, 129) steigt die Expression jedoch erneut stark an.

Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Interaktionspartner von p75NTR identifiziert, die zur Auslösung apoptotischer Signalwege führen. Neurotrophin receptor interacting factor (NRIF) führt über Bindung an p75ICD unter anderem zur Arretierung des Zellzyklus (149, 150) ähnlich wie auch neurotrophin receptor interacting melanoma associated antigen homolog (MRAGE) nach Bindung an den juxtamembranösen Part von p75NTR (151). P75-associated cell death executor (NADE) in Zusammenspiel mit der death domain führt besonders in Gegenwart von erhöhter Ligandenkonzentration nach Ischämie zu vermehrter Apoptose und zur Aktivierung von Caspase-3 über das Protein 14-3-3 (152-154).

Die neurotrophe Funktionsweise von p75NTR wird vornehmlich über die Bildung eines Komplexes mit Trk-Rezeptoren erreicht, der eine hohe Affinität für die Bindung von Neurotrophinen aufweist (155). Unter physiologischen Bedingungen binden die maturen Neurotrophine nach enzymatischer Abspaltung des Pro-Peptidteils an den Komplex und lösen

Signalkaskaden aus (s. 2.3.2.2.), die das Überleben der Zelle begünstigen sowie zur Stabilisierung und Differenzierung der Neurone beitragen (Abb. 5). Das Receptor Interacting Protein 2 (RIP2) kann zudem mit der death domain von p75NTR interagieren und über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuklear Faktor kappa B (NF κ B) das Überleben der Zelle sichern (156).

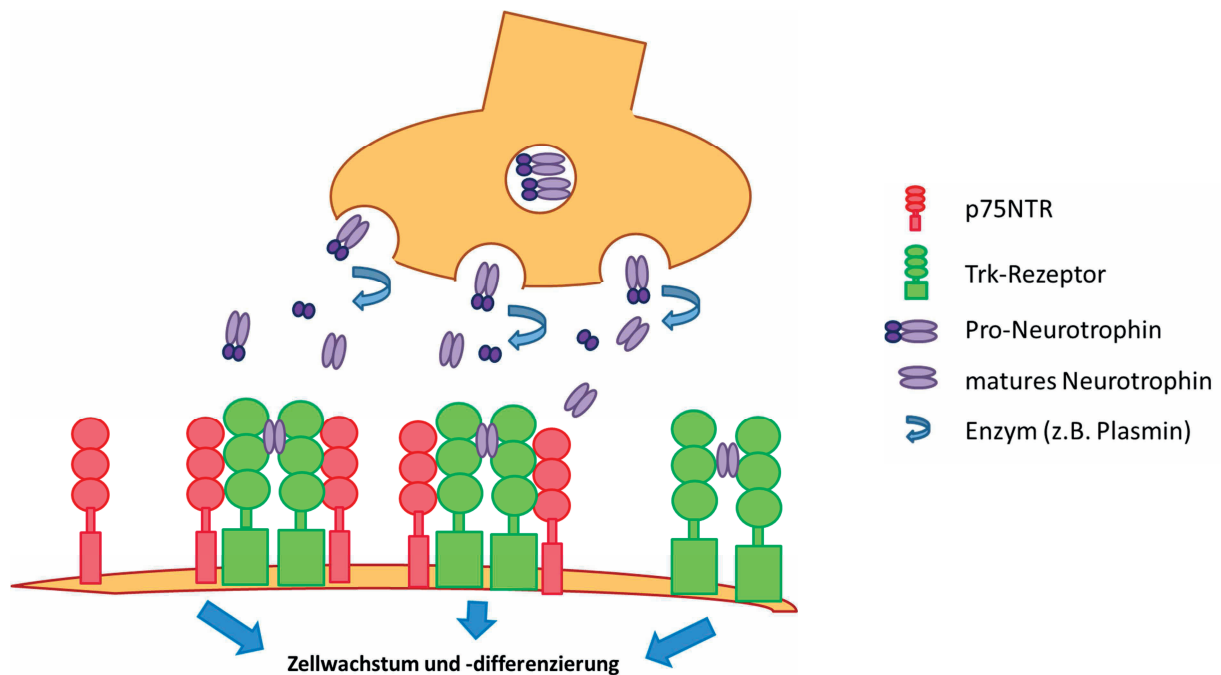


Abbildung 5: Neurotrophe Funktionsweise des p75NTR

2.3.2.2. Tyrosin Rezeptor Kinase Rezeptoren

Die Struktur der membranständigen Trk-Rezeptoren ist gekennzeichnet durch eine intrazelluläre Tyrosin Kinase, ein intramembranöses Verbindungsstück und einen extrazellulären Anteil. Letzterer ist gegliedert in drei Leucin-reiche Wiederholungen, die von jeweils einem Cystein Cluster flankiert werden. Membranständig schließen sich zwei Immunoglobulin-ähnliche Domänen an, von denen die zweite als Bindungsstelle für die Liganden fungiert (157).

Es gibt drei verschiedene Subtypen. Trk A wurde erstmals 1991 als hochaffiner Rezeptor für NGF beschrieben (158). Es folgten Trk B, der BDNF und NT-4/5 (124, 159) bindet sowie Trk C, der vornehmlich NT-3 bindet (160). In Abwesenheit von p75NTR können hohe Konzentrationen von NT-3 auch Trk B und NT-4/5 auch Trk A aktivieren (161).

Besonders während der neuronalen Entwicklungsphase ist die durch Trk-Rezeptoren vermittelte Wirkung von Neurotrophinen essentiell (117, 162). Die neurotrophe Wirkung wird

größtenteils über die Aktivierung von Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und Phospholipase C γ vermittelt als auch über die Ras-Raf-MEK-Erk-Signalkaskade (124, 163).

2.3.2.3 Sortilin

Sortilin ist ein 95kDa großer transmembranöser Rezeptor vom Typ 1. Morphologisch ist er gekennzeichnet durch den speziellen Aufbau seiner extrazellulären Domäne, den alle Proteine der *vacuolar protein sorting 10 protein* (VPS10P)–Familie aufweisen (164). Die Domäne besteht aus zwei kleinen 10 Cystein-reichen Domänen (10CC-a und -b) und einem 10-blättrigen Propeller, in dessen Innerem die Liganden binden (165). 1997 isolierte Petersen et al. den Sortilin-Rezeptor aus menschlichem Hirn. Die Struktur der extrazellulären Domäne war außergewöhnlich für Säugetiere und bis zu diesem Zeitpunkt nur von einem Sorting-Rezeptor der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* bekannt (166). Seitdem dient Sortilin als Prototyp der VPS10P-Familie, da die VPS10P-Domäne, im Gegensatz zu den anderen Vertretern, nur über einen kurzen transmembranen Teil mit der zytoplasmatischen Domäne verbunden ist, ohne weitere zwischengeschaltete Funktionselemente (167). Der Propeptidteil von Sortilin wird post-translational im trans-Golgi Netzwerk enzymatisch abgespalten (z.B. durch Furin) und der Rezeptor somit in seine aktive Form überführt (164, 168).

Die Hauptaufgabe des Rezeptors ist der Transport von Proteinen zwischen Zellkompartimenten und der Zelloberfläche, damit sie dort ihre Aufgaben als Effektoren in der Signaltransduktion wahrnehmen können, einer regulierten Sekretion oder Endocytose unterliegen oder dem Einschluss in Lysosomen zugeführt werden (167).

Der vorwiegende Teil von Sortilin wird in Neuronen exprimiert, wobei 90 % intrazellulär zu finden sind (169, 170). Außerhalb des Nervensystems reguliert es z.B. in der Leber die Ausscheidung von Lipoproteinen (171).

Ein besonderes Augenmerk für diese Arbeit liegt auf der Funktion von Sortilin als Co-Rezeptor von p75NTR. Ähnlich wie p75NTR ist auch Sortilin sowohl während der Entwicklung des Nervensystems (172) als auch unter pathologischen Bedingungen wie Parkinson (173), Krampfanfallsleiden (8) oder spongiformen Encephalopathien (174) vermehrt exprimiert. Insbesondere in diesen Situationen, in denen es zudem zu einer erhöhten Konzentration an Pro-Neurotrophinen kommt, bildet Sortilin einen Komplex mit p75NTR, der nach Bindung von Pro-NGF, Pro-BDNF oder Pro-NT-3 zur Auslösung apoptotischer Signalwege führt (145, 175). Sortilin kann nur als Teil dieses Komplexes fungieren und ist hierbei für die Bindung des Propeptidteils der Neurotrophine entscheidend (18), kann jedoch

allein keine Apoptose auslösen. Der programmierte Zelltod wird über NRAGE, c-Jun N-terminale Kinase 3 (JNK-3) und Caspase-3,-6 und -9 vermittelt (167). Auch während des Alterungsprozesses überwiegt der Zelltod, was mit einer gesteigerten Sortilin-Expression, Apoptose-Rate und restriktiven kognitiven Funktionen korreliert (176, 177).

Einschränkungen in seiner Funktion als Sorting-Rezeptor beeinflussen die neuronale Integrität nach Schlaganfall, Rückenmarksverletzungen, Alzheimer und bedingen die Ausbildung von Hypercholesterinämie oder Retina-Degeneration (178).

2.3.2.4. Regulation nach SHT

Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass es innerhalb einer Woche nach SHT zu einer massiven Dysregulation der Neurotrophinrezeptoren kommt (94). Während die Rezeptoren, die das Zellwachstum begünstigen zunächst stark herunterreguliert sind (Abb. 6), wird der Apoptose vermittelnde p75NTR vermehrt exprimiert (Abb. 7).

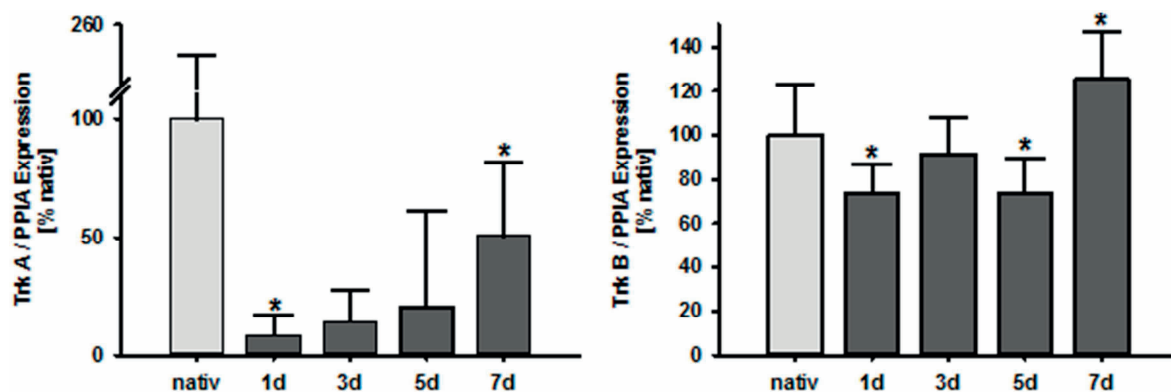


Abbildung 6: Trk-Rezeptor mRNA-Expression (94)

Diese erhöhte Expression ist bis zu 7 d nach Trauma nachweisbar. Ein ähnliches Bild zeigen Studien, die die zentrale Rolle von p75NTR nach anderen zerebralen Insulten wie Krampfanfallsleiden (11), Rückenmarksverletzungen (179) und Ischämie (180) belegen.

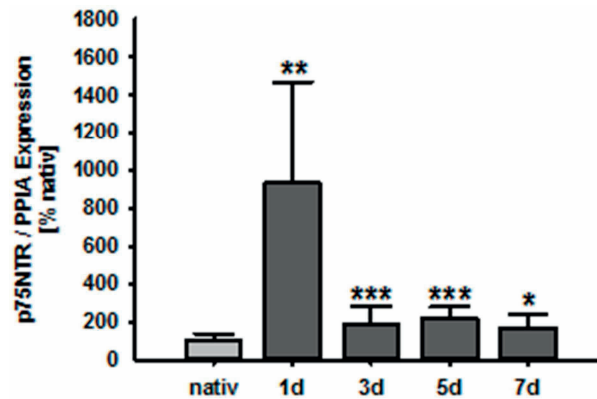


Abbildung 7: p75NTR mRNA-Expression (94)

Bisher unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen für Sortilin eine weniger ausgeprägte Veränderung der Expression innerhalb der ersten Woche nach SHT. 72 h nach CCI kommt es zu einer Reduktion der Sortilin-Expression im kortikalen perikontusionalen Gewebe (Abb. 8).

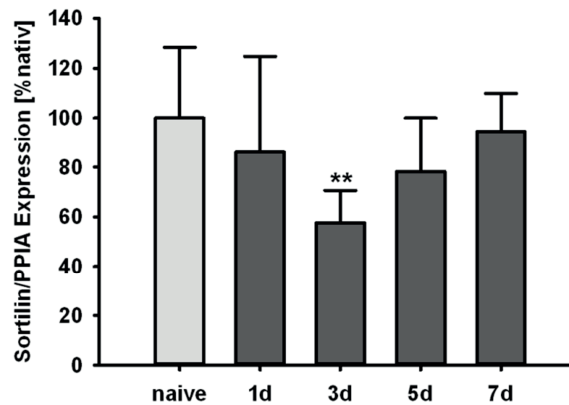


Abbildung 8: Sortilin mRNA-Expression

2.4. Propofol

Propofol (2,6-Diisopropylphenol) ist ein Hypnotikum ohne analgetisches Potential, gehört zur Gruppe der Injektionsnarkotika und ist gekennzeichnet durch seine schnell einsetzende und kurz anhaltende Wirksamkeit. Es ist stark lipophil und wird daher gelöst in einer Wasser-/Öl-Emulsion ausschließlich intravenös appliziert. Nach Applikation bindet es an Plasmaproteine und erreicht dadurch schnell alle Gewebe (181).

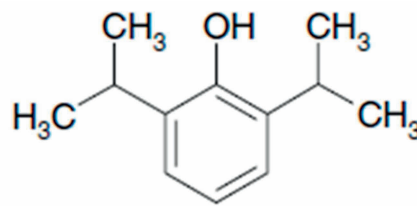


Abbildung 9: Strukturformel Propofol (182)

Seine zentral hypnotische Wirkungsweise wird hauptsächlich über den gamma-Aminobuttersäure (GABA) Rezeptor A vermittelt. Propofol bindet bevorzugt an dessen $\beta 3$ -Untereinheit und verstärkt so den inhibitorischen Effekt des Neurotransmitters GABA (183-185). Zusätzlich wirkt es hemmend auf exzitatorische glutamaterge N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDAR). Der pharmakokinetische Vorteil von Propofol besteht darin, dass es sich im Gegensatz zu z.B. Thiobarbituraten nicht im Fettgewebe ansammelt und somit problemfrei nachinjiziert werden kann oder auch im Rahmen einer totalen intravenösen Anästhesie (TIVA) zur Anwendung kommen kann (186). Propofol wird hauptsächlich über intra- und extrahepatische Glucuronidierung sowie Sulfatierung abgebaut und die entstehenden inaktiven Metabolite über die Niere ausgeschieden. Aufgrund der fehlenden analgetischen Wirkung wird es für längere Narkosen häufig mit anderen Anästhetika wie Ketamin oder Opioiden (z.B. Fentanyl) kombiniert. Oftmals wird es auch zur Narkoseeinleitung vor einer Inhalationsnarkose eingesetzt. Als Nebenwirkungen werden nach einer Bolusinjektion ein Abfall des Blutdrucks sowie ein darauffolgender reflektorischer leichter Anstieg der Herzfrequenz angegeben. Bei zu schneller Injektion kann es zu Atemdepression und Apnoe kommen (187). Die intravenöse Applikation geht beim Menschen (hier besonders bei Kindern) oft mit einer schmerzhaften Reizung der Gefäßwand einher (188). Bei Tieren ist dieses Phänomen selten zu beobachten (189).

2.4.1. Einsatz beim Menschen

Die Einsatzgebiete von Propofol in der Humanmedizin ähneln denen in der Veterinärmedizin stark. Neben der Einleitung der Allgemeinanästhesie und der TIVA findet Propofol Anwendung bei kleineren laparoskopischen Operationen und zur Langzeitsedierung von beatmeten Patienten. Vor allem bei Kindern wird diese Narkoseart aufgrund ihrer eingangs erwähnten Vorzüge eingesetzt und sowohl allein (190) als auch in Kombination mit Ketamin (191) von einigen Autoren als sicher bewertet. Bei Intensivpatienten (192) als auch bei Patienten mit traumatischen Hirnverletzungen (193) sind sowohl die gute Sedierungsqualität als auch die durch Propofol geförderte verkürzte Aufwachphase von großem Vorteil.

Ein beim Menschen nach (Langzeit-) Sedierung beobachtetes Phänomen wird als Propofol-Infusions-Syndrom (PRIS) bezeichnet. Es ist vornehmlich gekennzeichnet durch Herz-Kreislauf-Störungen, Laktatazidose und Rhabdomyolyse und endet in 85 % der Fälle tödlich (194). Über die genaue Pathogenese und weitere Faktoren, die bei der Entstehung und dem Verlauf des Syndroms eine Rolle spielen könnten, wird derzeit viel kontrovers diskutiert und geforscht (195, 196).

2.4.2. Einsatz beim Tier

In der Tiermedizin ist Propofol in Deutschland für Hund und Katze zugelassen. Bei lebensmittelliefernden Tieren ist der Einsatz nicht erlaubt (197). Bei Pferden steht Propofol auf der Positivliste (198) und kann somit bei Schlachtpferden mit entsprechendem Vermerk im Equidenpass und einer Wartezeit von sechs Monaten eingesetzt werden.

Die Angaben zur Halbwertszeit variieren je nach Quelle und Tierart, z.B. gibt das Lehrbuch für die Katze 55 min, für den Hund 15-23 (-100) min an (186).

Haupteinsatzgebiete der Propofolanästhesie beim Tier sind die Narkoseinduktion zur Erleichterung der, für die Inhalationsnarkose notwendigen, Intubation (199) sowie die TIVA im Rahmen von diagnostischen Untersuchungen (Magnet-Resonanz-Tomographie, Computer-Tomographie) oder therapeutischen Anwendungen (Dentaleingriffe, Scheren). Oftmals wird Propofol mit Ketamin zur TIVA eingesetzt. Dies führt zu einer geringeren Menge an benötigtem Propofol und zu einem positiven Effekt auf Herzfrequenz und mittleren arteriellen Blutdruck (200, 201). Besonders der analgetische Effekt von Ketamin auch in Kombination mit α 2-Agonisten favorisiert den Einsatz bei kürzeren operativen Eingriffen, wie z.B. bei der Ovariectomie bei der Katze (202). Zusätzlich verringert eine Prämedikation mit unter

anderem Acepromazin oder Atropin das Auftreten von Nebenwirkungen (189), so minimiert es das Risiko von Atemdepression (203). Insbesondere bei Hunden mit intrakraniellen Befunden ist die Propofolnarkose gegenüber der mit Isofluran zu präferieren, da die Auswirkungen auf das Herz-Kreislaufsystem günstiger sind und die Aufwachphase schneller verläuft (204). Beim Pferd eignet Propofol sich gut zur Einleitung, wohingegen andere Anästhetika und vor allem deren Kombinationen zur Aufrechterhaltung der Narkose vorgezogen werden sollten (205, 206).

Da Propofol hauptsächlich via Glucoronidierung intra- und extrahepatisch eliminiert wird, können bei der Katze, der diese Fähigkeit fehlt, speziesspezifische Nebenwirkungen auftreten. Besonders bei wiederholter oder langanhaltender Gabe kann es zu einer verlängerten Nachschlafphase sowie zur Bildung von Heinz' Körperchen und sogar Methämoglobinämie kommen (207, 208).

2.4.3. Neuroprotektiver Effekt

Aufgrund seiner günstigen pharmakokinetischen Eigenschaften wird Propofol bisher als sicheres Narkosemittel in SHT-Patienten angesehen (192, 193). Studien schreiben ihm einen günstigen Effekt in Bezug auf posttraumatische Exzitation, Ödembildung und neurologische Funktion zu. Nach traumatischen Hirnverletzungen kommt es vermehrt zu oxidativem Stress. Propofol wirkt dem positiv als Sauerstoffradikalfänger entgegen und verhindert Lipidperoxidation. Zusätzlich vermindert es die Glutamatfreisetzung und die Aktivierung exzitatorischer Rezeptoren (209). Überdies schränkt die posttraumatische Gabe des Hypnotikums die Ausbildung eines zerebralen Ödems über die modulierte Expression von Aquaporin-4 ein (210). Im Ischämie-Modell konnte in der Ratte gezeigt werden, dass Propofolgabe zu verbesserten neurologischen Werten und verringertem Schaden führt (211). Als mögliche Faktoren für Letzteres werden ein geringeres Maß an Apoptose und eosinophilen Neuronen angegeben (212). Propofol verstärkt *in vitro* zudem die durch Hypothermie hervorgerufene neuroprotektive Wirkung (213).

Beim Tier (unter anderem Hund und Katze) wird Propofol ein anti-krampfanfaller Effekt (214) sowie ein positiver Einfluss auf den intrakraniellen als auch auf den intraokulären Druck zugesprochen (20, 215). Einige Studien zeigen einen therapeutischen Effekt von Propofol bei der Behandlung von Krampfanfällen beim Hund (216, 217).

2.4.4. Neurotoxischer Effekt

Mehrere Studien belegen, dass der GABA_A-Rezeptor Agonist Propofol im juvenilen Hirn während der Synaptogenese zu vermehrter neuronaler Degeneration und Apoptose führt (218, 219), besonders ist dies in GABAergen Neuronen zu beobachten (220). Appliziert man schwangeren Mäusen Propofol führt dies in den fetalen Gehirnen zu gesteigerter apoptotischer Aktivität und persistierenden Lern-Defiziten (221). In Hühnerembryonen führen hohe Konzentrationen des Anästhetikums zum Absterben von Neuronen sowie zum Untergang von Neuriten durch Wachstumskegel-Kollaps (222). Auch in adulten Ratten führt Propofol zu erhöhter Mortalität und zur Beeinträchtigung von Neurogenese sowie neurologischer Funktion (24).

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die posttraumatische Propofolgabe (24h post CCI) den Sekundärschaden in der adulten Maus vergrößert. Dabei wird davon ausgegangen, dass Propofol die enzymatische Wirkung des tPA unterbindet (223). Somit kommt es zu erhöhten Konzentrationen von Pro-Neurotrophinen im synaptischen Spalt, die an den nach SHT vermehrt exprimierten p75NTR binden und somit pro-apoptotische Signalkaskaden auslösen (25). Dies ist in Abb. 10 schematisch dargestellt.

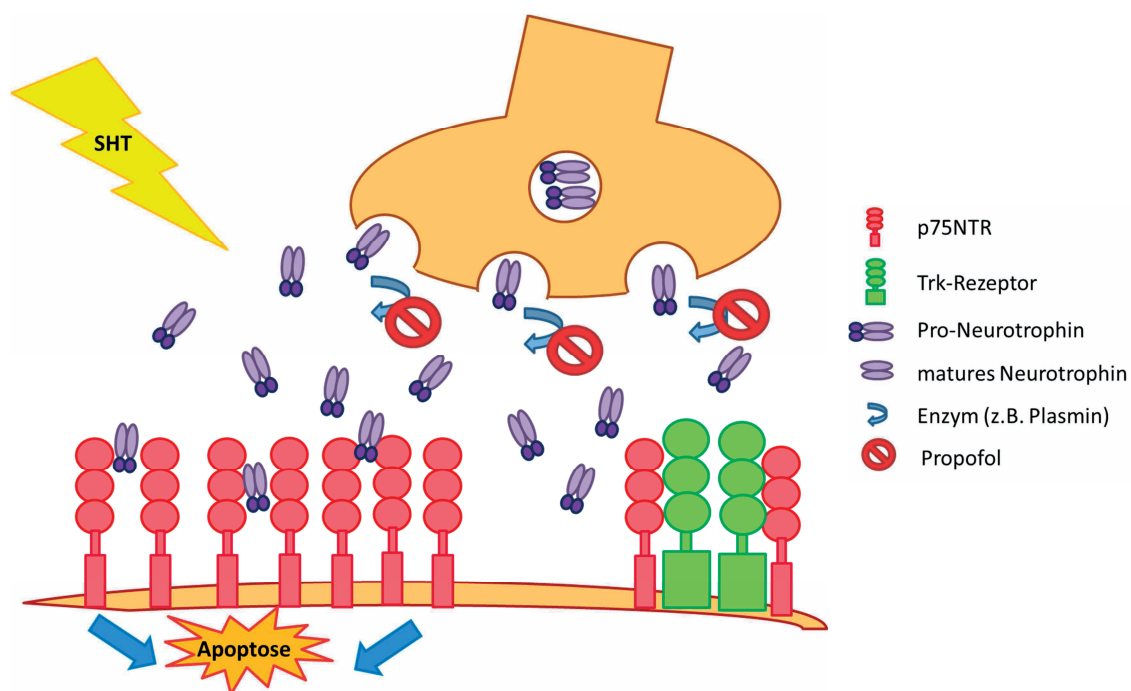


Abbildung 10: Auswirkung einer posttraumatischen Propofolgabe

Im Gegensatz zu dem unter 2.4.2. angegebenen anti-konvulsativen Effekt, konnte in anderen Studien bei Hunden eine vermehrte Exzitation (Myoklonus; bei Hunden mit vorangegangenen Krampfanfallsleiden bis Grand Mal Attacken) innerhalb weniger Stunden nach Propofolgabe bemerkt werden (224, 225), wobei die Genese dieser Krampfanfälligkeit kontrovers diskutiert wird (20).

3. Material

3.1. Geräte

Tabelle 2: Materialauflistung – Geräte

Gerät	Typ	Firma
Blotkammer	Mini Trans Blot System	BioRad, Hercules, USA
Detektionssystem	GloMax®-Multi+ Detection System	Promega, Mannheim, DE
Elektrophoresekammer	Mini Protean Elektrophoresis	BioRad, Hercules, USA
	XCell SureLock® Mini-Cell	Life Technologies; Darmstadt, DE
Gefrierschränke	-20 °C Liebherr GG 5210	Liebherr; Ochsenhausen, DE
	-30 °C, UPUL 540	Liebherr; Ochsenhausen, DE
	-80 °C	Heraeus Sepatech; Osterode, DE
Gehirnmatrix	Adult mouse brain slicer matrix	Zivic Instruments; Pittsburgh, USA
Gel-Analysator	QIAxcel Advanced System	Qiagen N.V.; Venlo, NL
Homogenisator	Mastermill MM 300	Retsch Technology GmbH, Haan, DE
Infra-rot Fluoreszenz System	Odyssey	Li-Cor Biosciences; Bad Homburg, DE
Inkubator	IC 8000	Dräger; Lübeck, DE
Kryostat	Microm HM 560 Cryo-Star	Thermo Fisher Scientific; Walldorf, DE
	Microm NX 70 Cryo-Star	Thermo Fisher Scientific; Walldorf, DE

LightCycler	LightCycler® 480	Roche Diagnostics; Mannheim, DE
Lochzange	Ohrlochzange	Zoonlab; Castrop-Rauxel, DE
Luftstromschrank (Tierschrank)	UniProtect THF 3378-VO2	Bioscape; Castrop-Rauxel, DE
Magnetrührer	Fisher Bioblock Scientific, 10515	Fisher Bioblock Scientific; Illkirch Graffenstaden, FR
Mikrobohrer	Uni-Drive N Komplettgerät	Paggen; Starnberg, DE
Mikroskop	Leica S8APO	Leica; Wetzlar, DE
Mikroskopie-Kamera	Leica Infinity X	Leica; Wetzlar, DE
Operations-Mikroskop	Technoskop OPMI 1-FC 459909	Zeiss Meditec; Jena, DE
Photometer	NanoVue™	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Pipetten	10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf; Hamburg, DE
Rota-Rod	RS232/LE8200	Hugo Sachs; March- Hugstetten, DE
Stereotaxierahmen		Kopf Instruments; Tujunga, USA
Schüttler	Rotamax 120	Heidolph; Schwabach, DE
Temperatursonde	TCAT-2DF Controller	Physitemp; New Jersey, USA
Traumamaschine	Typ SHTM3	Kopacz; Mainz, DE
Vapor	Vapor 19.3. Isofluran	Dräger; Lübeck, DE
Vortex	VF2, IKA-Labortechnik	Janke und Kunkel; Staufen, DE
Waagen	Sartorius research	Sartorius; Göttingen, DE
	CS-series 200 g	Ohaus; Kirchheim, DE

Wärmematte	MINCO HR 5491	Physitemp; New Jersey, USA
Zentrifugen	Centrifuge 5804 R	Eppendorf; Hamburg, DE
	Micro Star 17 R	VWR; Darmstadt, DE
	Sprout HSA 09711	Biozym; Hessisch Oldendorf, DE

3.2. Medikamente, Chemische Substanzen, Puffer, Reagenzien, Lösungen und Kits

Tabelle 3: Materialauflistung – Medikamente

Medikament	Genaue Bezeichnung	Hersteller
Anästhetika	Forene®, Wirkstoff: Isofluran	Baxter; Unterschleißheim, DE
Augensalbe	Bepanthen® Augensalbe	Bayer Vital; Leverkusen, DE
Gewebekleber	Histoacryl®	B. Braun Melsungen AG; Melsungen, DE
Lipofundin®	Lipofundin® MCT 20 %	B. Braun Melsungen AG; Melsungen, DE
Pharmakologischer Inhibitor von p75NTR	TAT-Pep5	PANATecs; Heilbronn, DE
Propofol	Propofol-®Lipuro 10 mg/ml; 1 %	B. Braun Melsungen AG; Melsungen, DE

Tabelle 4: Materialauflistung – Chemische Substanzen

Chemische Substanz	Hersteller
Acrylamide/Bis (30 %)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe, DE
Albumine Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe, DE
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe, DE

Aqua dest.	B. Braun Melsungen AG; Melsungen, DE
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH; Karlsruhe, DE
Chloroform	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
Ethylendiaminetetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe, DE
Ethanol	Applichem; Darmstadt, DE
Flüssiger Stickstoff	Air Liquide S.A.; Düsseldorf, DE
Glycin	Applichem; Darmstadt, DE
Isopropanol	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
Isotonische Kochsalzlösung	B. Braun Melsungen AG; Melsungen, DE
Kaliumchlorid (KCl)	Merck; Darmstadt, DE
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck; Darmstadt, DE
Kresylviolett (Acetat)	Merck; Darmstadt, DE
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH; Karlsruhe, DE
Magic Marker XP Western Standard	Invitrogen; Carlsbad, USA
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
Methanol	Applichem; Darmstadt, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe, DE
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	BioRad; Hercules, USA
Nonidet P-40 (NP-40)	Applichem; Darmstadt, DE
PonceauS	Carl Roth GmbH; Karlsruhe, DE
Prestained Full-Range Rainbow Marker	GE Healthcare; Buckinghamshire, GB
Protease inhibitors	Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, DE
RNase freies Wasser	Fermentas; St. Leon Rot, DE
Roti®Histokitt	Carl Roth GmbH; Karlsruhe, DE

Roti®-Histol	Carl Roth GmbH; Karlsruhe, DE
Salzsäure (HCl)	Merck; Darmstadt, DE
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe, DE
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe, DE
Tween-20	GE Healthcare; Buckinghamshire, GB

Tabelle 5: Materialauflistung – Puffer, Reagenzien und Lösungen

Puffer	Hersteller
Antikörper Lösung	2,5 % (w/v) Magermilch in TBST
Blotpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) MeOH
gDNA Eliminator	Qiagen N.V.; Venlo, NL
DC TM Protein Assay Reagent A,B und S	BioRad, Hercules, USA
Kresylviolett Lösung	0,031 mM Kresylviolett , 20 % (v/v) Ethanol 30 min bei 50 °C;
NuPAGE MOPS SDS running buffer (20x)	Life Technologies; Darmstadt, DE
RIPA-Puffer	1 M Tris pH 7,4 , 1 M NaCl, 0,5 M EDTA, 10 % (v/v) NP40, 15 % (v/v) Protease-Inhibitor
RPE Puffer	Qiagen N.V.; Venlo, NL
RWT Puffer	Qiagen N.V.; Venlo, NL
Sammelgelpuffer	50 mM Tris 4 % (v/v) SDS, pH 6,8
SDS-Ladepuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 10 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 0.1 % (w/v) Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS

TBS / TBST	15 mM NaCl, 5 mM Tris, 0,2 mM HCl, pH 7,4 / + 0,05 % (v/v) Tween-20
Trenngelpuffer	150 mM Tris, 4 % (v/v) SDS, pH 8,8

Tabelle 6: Materialauflistung – Polymerase Kettenreaktion (PCR) Kits

Kit	Hersteller
Absolute Blue qPCR SybrgreenMix	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
DyNAmo™ ColorFlash Probe qPCR Kit	Thermo Fisher Scientific; Schwerte, DE
Fast Tissue-to-PCR Kit	Fermentas; St. Leon Rot, DE
KapaProbeFast qPCR	PEQLAB Biotechnologie GmbH; Erlangen, DE
LightCycler® 480 Probes Master	F. Hoffmann-La Roche AG; Basel, CH
Maxima Probe qPCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific; Schwerte, DE
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen N.V.; Venlo, NL
RNeasy Mini Kit	Qiagen N.V.; Venlo, NL

3.3. Primer, Sonden, Assays und Antikörper

Tabelle 7: Materialauflistung – Primer und Sonden

Target	Primer	Basenabfolge 5'→3'
BDNF	BDNF F	ACTTGGCCTACCCAGGTG
	BDNF R	GTTGGGCCGAACCTTCT
IL-1 β	muIL 1b S	GTGCTGTCGGACCCATATGAG
	muIL 1b A	CAGGAAGACAGGCTTGTGCTC
IL-6	mIL6 F(ex2,3)	TCGTGGAAATGAGAAAAGAGTTG
	mIL6 R(ex5,6)	TATGCTTAGGCATAACGCACTAG
iNOS	mNOS2 F	TGTGTCAGCCCTCAGAGTAC
	mNOS2 R	CACTGACACTYCGCACAA
NGF A	NGF A F	CGGGCAGCTTTTTGGAA
	NGF A R	ACCTCACTGCGGCCAGTA
p75NTR (mRNA)	NGFR F	GGGGTGGGCTCAGGACT
	NGFR A	TATGAGGTCTCGCTCTGGAGGT
p75NTR (DNA)	WT-F1	CCGCAGGTGTTACGTTCTCTGACGT
	WT-R1	CATTCGGCGTCAGCCCAGGG
	NeoMy-F2	CAGACAATCGGCTGCTCTGA
	NeoMy-R2	GATGTTTCGCTTGGTGGTCG
NTRK1	NTRK1 F	GCCTAACCATCGTGAAGAGTG
	NTRK1 R	CCAACGCATTGGAGGACAGAT
NTRK2	NTRK2 F	CTGGGGCTTATGCCTGCTG
	NTRK2 R	AGGCTCAGTACACCAAATCCTA
PPIA	PPIA F	GCGTCTSCTTCGAGCTGTT
	PPIA R	RAAGTCACCACCCTGGCA
Sortilin	Sort1 F	GCTCTCAGAAGCATTACAC

(mRNA)	Sort1 R	TTCCATTCAATTCACGGCAC
Sortilin (DNA)	Sort GF	GGGACCAAAGGGCTAGATTGC
	Sort GR	TCCGAAGGAGACACTCACAATTC
	Sort GX	ATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTG
TNF α	TNF α F	TCTCATCAGTTCTATGGCCC
	TNF α R	GGGAGTAGACAAGGTACAAC
Target	Sonden	Basenabfolge 5'→3'
BDNF	BDNF FL	AGAGGTCTGACGACGACATCACTGGC--FL
	BDNF Cy5	Cy5-GACACTTTTGAGCACGTCATCGAAGAGCTG--PH
Il-1 β	muIL 1b FL	TAATGAAAGACGGCACACCCACCC--FL
	muIL 1b Cy5	Cy5-CAGCTGGAGAGTGTGGATCCCAAG C--PH
IL-6	mIL6 FL	CATAAAATAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC--FL
	mIL6 Cy5	Cy5--TGCTCTCCTAACAGATAAGCTGGAGTCAC--PH
iNOS	NOS2 FL	GAAGCCCCGCTACTACTCCATC--FL
	NOS2 Cy5	CY5-GCTCCTCCCAGGACCACACCC--PH
NGF A	NGF A FL	ACCCAAGCTCACCTCAGTGTCTGG--FL
	NGF A CY5	Cy5-CCCAATAAAGGTTTTGCCAAGGACGC--PH
p75NTR	NGFR FL	GTGCACGCCCTGGGCTGAC--FL
	NGFR Cy5	Cy5-CCGAATGCGAGGAGATCCCTGGCC--PH
PPIA	PPIA FL	GCTCTGAGCACTGGRGAGAAAGGA--FL
	PPIA Cy5	Cy5-TTGGCTATAAGGGTTCCTCCTTTTCACAG--PH
Sortilin	Sort1-FL	GCAGCCTTGGAGCATCATAAGC--FL
	Sort1-Cy5	Cy5-TGGCTGGTGGGCATAGTTATTCTC--PH

Tabelle 8: Materialauslistung – Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Molekulare Masse des Antigens	Hersteller
Anti- α II-Spectrin (BML-FG6090)	Maus	1:1000	α II-Spectrin: 240 kDa Spaltfragment: 145kDa/150kDa	Enzo Life Science; Farmingdale, USA
Anti-GAPDH (ACR001PS)	Maus	1:2000	37 kDa	Acris Antibodies Inc.; San Diego; USA
Anti-p75NGF Receptor(ab38335)	Kaninchen	1:500	75 kDa	Abcam; Cambridge, UK
Anti-Sortilin (ANT-009)	Kaninchen	1:500	100 kDa	Alomone Labs; Jerusalem, IL

Tabelle 9: Materialauflistung - Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus (IRDye 680RD)	Ziege	1:15000	Li-Cor Bioscience GmbH; Bad Homburg, DE
Anti-Kaninchen (IRDye 800CW)	Ziege	1:15000	Li-Cor Bioscience GmbH; Bad Homburg, DE

3.4. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10: Materialauflistung - Verbrauchsmaterialien

Material	Nähere Bezeichnung	Hersteller
96-well Platte	Zellkultur Microplatte 96 Well	Greiner Bio One; Kremsmünster; A
Deckgläser	24 x 60 mm	Diagonal GmbH & Co KG; Münster, DE
Einbettmedium	NEG-50 TM	Thermo Fisher Scientific; Schwerte, DE
Einstreu	Lignocel® FS14	J.Rettenmaier & Söhne GmbH&Co KG; Rosenberg, DE
Einwegpipetten	5 ml, 10 ml	VWR international, Radnor, USA
Einwegspritzen	Injekt-F® 1 ml	B. Braun Melsungen AG; Melsungen, DE
Filterpapier		Whatmann; Maidstone, UK
Futterpellets	Maus Zucht Extrudat	ssniff Spezialdiät GmbH; Soest, DE
Gele	NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gel, 1,5 mm, 12 Well	Life Technologies; Darmstadt, DE
Käfige	Filtertopkäfig Typ-II lang	Bioscape GmbH; Castrop-Rauxel, DE
Kanülen	Microlance TM (26G x 1/2“)	BD; Heidelberg, DE
Kryotomklingen	Feather® A35	B. Braun Melsungen AG; Melsungen, DE
LightCycler® Kapillaren		F. Hoffmann-La Roche AG; Basel, CH
Membranen	PVDF Membran (0,45 µm)	Millipore; Billerica, USA
Nahtmaterial	Prolene® 6-0	Ethicon Inc.; Somerville, USA
Objektträger	SuperFrost® Plus	Menzel-Gläser; Menzel GmbH, Braunschweig, DE

Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 1000 µl	Starlab GmbH; Ahrensburg, DE
Papierfilter	MN 615 1/4	Marchery-Nagel; Düren, DE
Papierhandtücher	25 x 21 cm, grün, ZZ Falz, 1-lagig	Schuch Laborhandel und Klinikbedarf; Langgöns, DE
Reaktionsgefäße	Multiply®-Pro 0,5 ml	Sarstedt; Nürnbrecht, DE
Reaktionsgefäße	1,5 ml, 2 ml	Eppendorf; Hamburg, DE
Saugtupfer	Sugi®	Kettenbach GmbH&Co KG; Eschenburg, DE
Skalpell	Feather® No.23	B. Braun Melsungen AG; Melsungen, DE
Transferpipette	1ml	Sarstedt; Nürnbrecht, DE
Wattestäbe	Holzwattestäbe; kleiner Kopf; 15 cm	Centramed Medizintechnik; Koblenz, DE
Zentrifugenröhrchen	Falcon® 15 ml, 50 ml	VWR international; Radnor, USA

3.5. Software

Tabelle 11: Materialauflistung – Software

Software	Hersteller
DeltaPix InSight, Version 4.0	DeltaPix; Maalov, DK
Endnote X7	Thomson Reuters Corporation; New York, USA
Image Studio Version 3.1	Li-Cor Biosciences; Bad Homburg, DE
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation; Redmond, USA
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation; Redmond, USA
LightCycler Software, Version 4.5	F. Hoffmann-La Roche AG; Basel, CH
Sigma Plot, Version 12.5	Systat Software; San José, USA

4. Methoden

4.1. Genehmigung der Tierversuche

Alle Tierversuche, die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurden, sind nach TSchG §8 in der Fassung vom 18. Mai 2006 genehmigt (226).

Der zugehörige Tierversuchsantrag mit dem Aktenzeichen 23 177-07/G 12-1-010 wurde vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz bewilligt.

4.2. Mäuse

4.2.1. C57Bl6-N

Für die Zeitreihenversuche sowie für die Versuche zur Untersuchung des Effektes des pharmakologischen Inhibitors von p75NTR (TAT-Pep5) wurden ausschließlich männliche C57Bl6-N Mäuse (>21 g) eingesetzt. Diese wurden von Charles River Deutschland GmbH (Sulzfeld, DE) bezogen.

4.2.2. p75NTR *knock-out* Maus

Zur Untersuchung der Rolle von p75NTR nach SHT wurden zwei männliche und vier weibliche heterozygote (HE) p75NTR Mäuse von The Jackson Laboratories (Maine, USA) geordert. Diese Tiere bildeten den Grundstock für die Zucht im Tierstall der Zentralen Versuchstiereinrichtung der Universitätsmedizin in Mainz. Alle in dieser Doktorarbeit eingesetzten p75NTR - Tiere sind selbstgezeugene Nachkommen dieser Zuchtpaare.

Die exakte Bezeichnung des Stammes lautet: B6.129S4-Ngfr^{tm1Jae/J}.

NGFR steht hier noch für die veraltete Bezeichnung des p75NTR (s. 2.3.2.1.1.). Entwickelt wurden die Tiere im Labor von Herrn Dr. Rudolf Jaenisch am Whitehead Institute for Biomedical Research am Massachusetts Institute of Technology. Hierzu verwendete man die 129/Sv-derived J1 ES (Embryonische Stammzellen) Zelllinie und als genetischen Hintergrund die C57Bl6-J Linie. Zu Selektionszwecken wurde zuerst eine Neomycinkassette im 3. Exon des p75NTR-Gens eingefügt. Das führt zur Unterbrechung der Gensequenz, die für die Cysteinwiederholungen 2, 3 und 4 codiert. Northern Blot Analysen zeigten, dass das mutierte Gen keine vollständige mRNA erzeugt. Trotzdem konnte in nachfolgenden RT-PCR

Analysen ein endogenes alternatives Transkript nachgewiesen werden, dem das Exon 3 fehlt. Western Blot Analysen belegen, dass in Mäusen, die homozygot für die Mutation sind, kein vollständiges Protein gebildet wird. Dafür konnte eine Isoform, der die Cysteinwiederholungen 2, 3 und 4 fehlen, sowohl in Wildtyp (WT) als auch in *knock-out* (KO) Mäusen detektiert werden (227). *In vitro* Versuche konnten zeigen, dass diese Isoform ein transmembranes Protein ist, das mit anderen Trk-Rezeptoren interagieren, jedoch keine Neurotrophine binden kann (227, 228). Die Mäuse sind lebensfähig und fertil.

4.2.2.1. Genotypisierung

Zu Kennzeichnungszwecken und zur Überprüfung des Genotyps werden die Jungtiere zum Zeitpunkt des Absetzens (\pm drei Wochen) mittels einer Ohrlochzange markiert. Die dabei gewonnenen Ohrstanzen werden zur Genotypisierung verwendet. Mit Hilfe des Fast Tissue-to-PCR Kits wird nach Herstellerangaben die genomische DNA (gDNA) isoliert, die daraufhin im Thermocycler für die PCR eingesetzt wird (s. 4.13.). Die Annealingtemperatur beträgt 60 °C. Die Genotypisierung erfolgt hier in zwei voneinander getrennten Nachweisläufen. In einem Lauf werden die WT-Primer dazugegeben, die an Mus musculus strain Chromosom 11, GRCm38.p1 C57BL/6J binden. Im anderen Lauf gibt man die Primer zum Nachweis der Neomycinkassette hinzu. Anschließend werden die entstandenen Produkte im Gel-Analysator untersucht. Je nachdem welche p75NTR-Primer binden und welche Produkte und somit Banden infolgedessen entstehen, kann man nachstehende Genotypen unterscheiden:

- KO \triangleq p75NTR^{ExonIII^{-/-}}: Bei diesen Tieren ist auf beiden Allelen die Neomycinkassette eingebaut, sodass nur die oben genannte Isoform, nicht jedoch das vollständige p75NTR-Protein, ausgebildet wird.
- HE \triangleq p75NTR^{ExonIII^{+/-}}: Bei diesen Tieren trägt nur ein Allel die Neomycinkassette, sodass es zu einer verminderten Expression des Rezeptors kommt.
- WT \triangleq p75NTR^{ExonIII^{+/+}}: Bei diesen Tieren ist keine Neomycinkassette inseriert, sodass der funktionsfähige Rezeptor in vollem Umfang exprimiert wird.

Tabelle 12: Genotypisierung p75NTR - PCR Banden

Genotyp	Bindende Primer	Amplikon	Offizielle Bezeichnung
KO	NeoMy-F2/ NeoMy-R2	340 Basenpaare (bp)	p75NTR ^{ExonIII/-}
HE	NeoMy-F2/ NeoMy-R2 + WT-F1/WT-R1	340bp + 361bp	p75NTR ^{ExonIII+/-}
WT	WT-F1/WT-R1	361bp	p75NTR ^{ExonIII+/+}

Die korrekte Bezeichnung der Genotypen lautet p75NTR^{ExonIII}, gefolgt von zwei hochgestellten Plus- bzw. Minuszeichen, getrennt durch ein Slashzeichen (/). Dies symbolisiert das Vorhandensein (+) oder Nichtvorhandensein (-) des funktionsfähigen Gens (Tab. 12). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden jedoch die Bezeichnungen KO und WT verwendet, da sie eingängiger sind. Für die Versuche wurden nur die KO- und WT-Tiere eingesetzt. Die HE-Tiere dienen zur Zuchterhaltung.

Um etwaige Verwechslungen im Laufe der Versuchsvorbereitung und –durchführung auszuschließen, wird allen Tieren nach der Euthanasie die Schwanzspitze entfernt und das Material erneut mittels PCR analysiert (Nachgenotypisierung).

4.2.2.2. Verifizierung des KO

Zur Überprüfung des KO wurden von jedem Genotyp Hirnproben von Nativtieren mittels qualitativer *Real-Time PCR* (qRT-PCR) untersucht (n = 2). Die Ergebnisse sind unter 5.1.1. dargestellt.

4.2.3. Sortilin *knock-out* Mäuse

Um die Rolle des Sortilin-Rezeptors näher zu beleuchten, wurden Mäuse eingesetzt, die ursprünglich von Herrn Prof. Thomas E. Willnow von der Charité in Berlin nach Mainz importiert wurden. Auch hier sind alle in den Versuchen beschriebenen Tiere Nachkommen aus heterozygoten Verpaarungen dieser importierten Tiere.

Die exakte Bezeichnung des Stammes lautet: B6.ICp4.Sort1^{tm1Tew}.

Das Sort1-Gen liegt auf Chromosom 3, GRCm38.p1 C57BL/6J. Als ES-Zelllinie wurde ICp4, als genetischer Hintergrund C57BL/6J eingesetzt. Zur Generierung der KO-Mäuse wurden mittels homologer Rekombination 126 bp des Exons 14 und 303 bp des darauffolgenden Introns durch eine Neomycinkassette ersetzt. Daraus resultieren ein WT-Allel mit einer Größe von 6,4 Kilobasen und ein KO-Allel mit 3 Kilobasen (18).

4.2.3.1. Genotypisierung

Analog zu 4.2.2.1. wurden Proben entnommen und genotypisiert. Die Annealingtemperatur beträgt 60 °C.

Die Zuordnung zu KO, HE und WT und deren korrekte Bezeichnung korrelieren auch mit den Beschreibungen unter 4.2.2.1. (Tab. 13). Somit werden KO-Tiere offiziell mit Sort^{-/-} und WT-Tiere mit Sort^{+/+} beschrieben, im Verlauf der Dissertation werden jedoch die Bezeichnungen KO und WT verwendet.

Tabelle 13: Genotypisierung Sortilin - PCR Banden

Genotyp	Bindende Primer	Amplikon	Offizielle Bezeichnung
KO	Sort GF/ Sort GX	206bp	Sort ^{-/-}
HE	Sort GF/ Sort GX	206bp	Sort ^{+/-}
	+ Sort GF/ Sort GR	+ 293bp	
WT	Sort GF/ Sort GR	293bp	Sort ^{+/+}

Wie bei den p75NTR-Mäusen wurden auch den in den Versuchen eingesetzten Sortilin-Tieren zur Sicherheit nach der Euthanasie die Schwanzspitzen entfernt und erneut genotypisiert (Nachgenotypisierung).

4.2.3.2. Verifizierung des KO

Um zu überprüfen, ob in den KO-Tieren ein vollständiges Sortilin-Protein ausgebildet wird, wurde Hirngewebe (Trimmquadranten) von nativen Sortilin-KO- und WT-Tieren im Western Blot untersucht (n = 3). Die Ergebnisse sind unter 5.1.2. abgebildet.

4.3. Maushaltung

Alle eingesetzten Tiere wurden in den Tierställen der Zentralen Versuchstiereinrichtung der Universitätmedizin Mainz gezüchtet und gehalten. Im Hygienekonzept stuft man die Haltung dort als Speziell Pathogen Freie (SPF) Barriere ein. Dies bedeutet, dass eine repräsentative Anzahl an Mäusen vierteljährlich einem Hygienemonitoring auf bestimmte Keime unterzogen wird, die in dieser Haltungsform nicht vorkommen dürfen. Dieses System ist durch die Federation of European Laboratory Animals Science Associations (FELASA) akkreditiert (229).

Während der Zeit, in der die Versuche an den Tieren durchgeführt wurden, befanden sie sich in einem Tierschrank. Dieser steht in einem Forschungslabor der Klinik für Anästhesiologie und ist nach TSchG §11 als Tierhaltung vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz genehmigt worden. Die Tiere werden laut TSchVersV §1 Absatz 1 mindestens (mind.) einmal pro Tag zur Überprüfung des Wohlergehens in Augenschein genommen (230).

4.3.1. Stall und Käfige

Die Mäuse werden nach Geschlechtern getrennt in Gruppen von max. fünf Tieren in Typ2-Filtertop Käfigen gehalten. Käfige zur Haltung von Mäusen als Versuchstiere müssen eine Mindestfläche von 330 Kubikzentimeter (cm²) aufweisen und mit Einstreu gefüllt sein. Da Mäuse soziale Lebewesen sind, ist die Gruppenhaltung obligatorisch. Hiervon gibt es allerdings zwei Ausnahmen:

1. Während des Experiments sitzen die Tiere einzeln, da sie sonst dazu tendieren, die Näfte der anderen anzufressen, was zu Wundheilungsstörungen führen kann.
2. Männliche Tiere (Böcke) kann man nur direkt nach dem Absetzen mit anderen Böcken zusammensetzen. Wird ein Bock einmal entfernt, z.B. zum Zuchteinsatz, kann er danach nicht erneut einer Gruppe mit männlichen Tieren zugeführt werden und muss demnach anschließend allein gehalten werden, da sie zu stark aggressivem Verhalten neigen (231). Weibchen kann man auch im Nachhinein in den meisten Fällen wieder mit anderen weiblichen Tieren vergesellschaften.

Zuchtkäfige werden mit einem Bock und max. zwei Weibchen bestückt. Die Jungtiere werden im Alter von \pm drei Wochen abgesetzt, da sie zu dem Zeitpunkt nicht mehr gesäugt werden und Platz für den nächsten Wurf geschaffen werden muss. Dies ist nötig, da die Weibchen oft

direkt nach der Geburt wieder gedeckt werden und die nächsten Jungen nach 21 d Tragezeit gebären (232).

Es ist gesetzlich vorgeschrieben, dass die Käfige mit Nestbaumaterial und sogenanntem Enrichment ausgestattet sind (233, 234). Zu diesem Zweck werden die Käfige mit weichen grünen Papierhandtüchern und Kunststoffrollen bestückt. Je nach Besatzdichte werden die Käfige ein bis zwei Mal pro Woche gewechselt.

4.3.2. Fütterung

Allen Mäusen wird ein Spezialfutter in pelletierter Form ad libitum angeboten. Dies befindet sich in einem Gitter über den Tieren, damit es nicht zur Kontamination des Futters kommt. Die Tiere haben stets Zugang zu frischem Trinkwasser in Flaschen. Neugeborene werden von der Mutter gesäugt. Um den 14. Tag fangen sie an, zusätzlich eigenständig Futter und Wasser zu sich zu nehmen. Der tägliche Futterbedarf liegt bei 3-6 g/d und der Wasserbedarf bei 4-7 Milliliter (ml)/d (232). Nach chirurgischen Eingriffen bekommen die Tiere einzelne Futterpellets in den Käfig gelegt, an die sie leichter gelangen, um die Futteraufnahme zu gewährleisten, wenn sie durch Operation und Anästhesie geschwächt sind. Futter und Wasser werden im Rahmen des Käfigwechsels mit erneuert.

4.3.3. Haltungsparemeter

Nach Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde - Society for Laboratory Animal Science (GV-SOLAS) sind bestimmte Parameter in der Haltung von Labormäusen einzuhalten (Tab. 14) (235).

Tabelle 14: Parameter zu Haltung von Labormäusen

Parameter	Wert
Lichtregime	12 h Hell-Dunkel-Rhythmus
Lichtintensität	< 200 Lux
Luftwechselrate	10-20 / h (je nach Besatzdichte)
Raumtemperatur	20-24 Grad Celsius (°C)
Relative Luftfeuchte	~55 %

Im Tierschrank ist während der Dunkelphase eine rote Beleuchtung eingeschaltet. Da Mäuse Licht mit einer Wellenlänge von > 580 Nanometern (nm) nicht wahrnehmen können, ist es dem Experimentator jederzeit möglich, das Wohlergehen der Tiere zu begutachten, ohne deren circadiane Rhythmik dabei zu stören.

4.4. Anästhesie

Sowohl die Narkoseeinleitung als auch die Erhaltungsnarkose beruhen auf dem Prinzip, der Inhalationsnarkose. Hierbei sind die anästhetisch wirksamen Substanzen in einem Luft-Sauerstoff Gemisch gelöst, welches vom Patienten bzw. vom Versuchstier eingeatmet wird. Mittels eines Vapors kann man die Konzentration des Gasgemisches regulieren. Der Vorteil dieser Narkoseart ist, dass durch die hohe Lipidlöslichkeit ein schnelles An- und Abfluten erreicht wird, was zu einer sehr guten Steuerbarkeit führt (186). Das hier eingesetzte Hypnotikum Isofluran ist sowohl in der Veterinär- als auch in der Humanmedizin ein gängiges Narkosemittel.

Zuerst werden die Mäuse für 1 min unter einen Trichter gesetzt. Dort beträgt die Isofluran-Konzentration 4 Volumenprozent (Vol. %). Danach werden die Mäuse in den stereotaktischen Rahmen eingespannt. Über eine Atemmaske sind sie an das Narkosegerät angeschlossen (Abb. 11). Während der Operation beträgt die Isofluran-Konzentration je nach Tier zwischen 1,8 – 2,2 Vol. %.

Die Narkostiefe wird insbesondere durch den Zwischenzehenreflex an der Hintergliedmaße regelmäßig überprüft. Befindet sich das Tier im gewünschten Narkosestadium der Toleranz (nach Guedel) reagiert es nicht mehr mit Abwehrbewegungen nach schmerzhafter Manipulation im Zwischenzehenspalt.

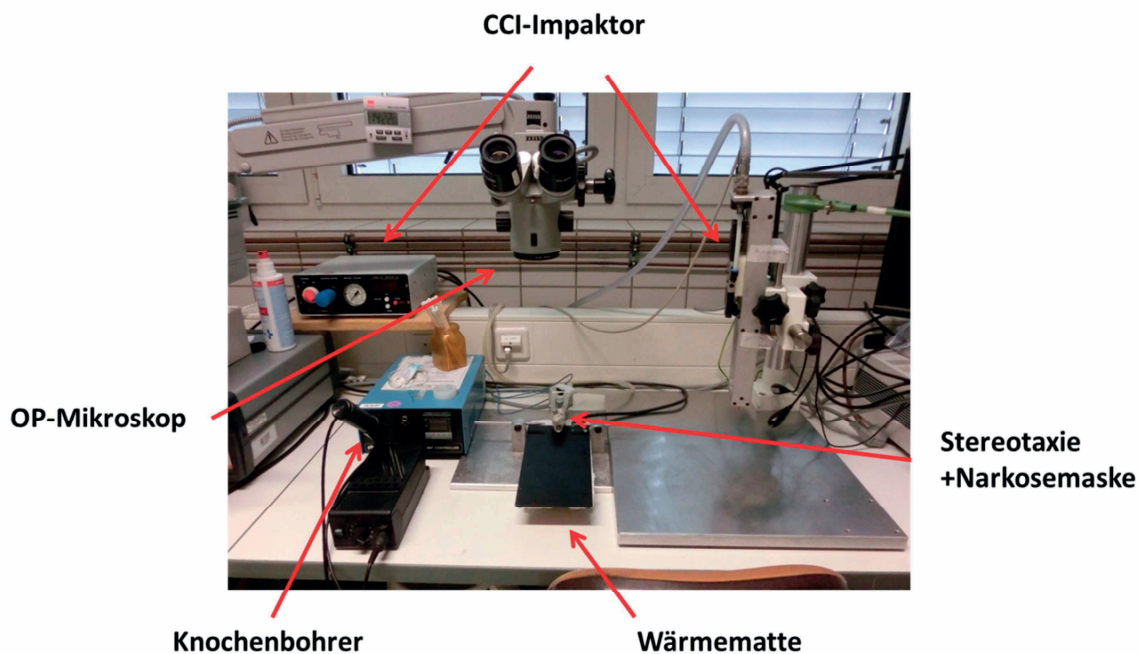


Abbildung 11: Operations-Platz

4.5. CCI

In der vorliegenden Dissertation wird der CCI als SHT-Modell eingesetzt, da es einen vergleichbaren Schaden induziert, es in unserem Labor etabliert ist und die hier erhobenen Daten so in Zusammenhang mit bereits vorhandenen Ergebnissen gebracht werden können.

4.5.1. Durchführung

Nachdem das Tier in Narkose gelegt worden ist, wird es in den stereotaktischen Rahmen eingespannt (Abb. 11). Hierbei ist darauf zu achten, die Incisivi des Oberkiefers in die dafür vorgesehene Halterung einzuhängen, ohne sie zu verletzen. Dadurch wird zum einen garantiert, dass, die Maus über das geöffnete Maul atmen und die Narkose wirken kann und zum anderen, dass der Kopf der Maus fixiert ist. Hierzu wird zusätzlich noch die Schraube des Stereotakts angezogen, damit der Kopf kein Spiel mehr hat. Dies ist wichtig, damit die Verletzungsgefahr für das Tiere minimiert und die Vergleichbarkeit der Operationen untereinander gegeben ist. Es ist sicherzustellen, beide Augen gut mit Augensalbe zu benetzen, da die Augen während der Narkose nicht geschlossen werden und ansonsten austrocknen würden. Ist das Tier gut fixiert, wird das Fell am Scheitel mit isotoner Kochsalzlösung benetzt. Anschließend wird mit einer Schere die Kopfhaut auf einer Länge von ca. 1,5 Zentimeter (cm) sagittal eröffnet und der Schädelknochen freigelegt. Das Periost wird mit einem Wattestab vorsichtig vom Knochen gekratzt. Ausgehend von den Schädelnähten (Abb. 12) wird nun auf der rechten Seite mit dem Mikrobohrer ein ca. 0,7 x 0,7 cm großes Fenster in den Knochen gefräst. Die Fensterseite, die der Sagittalnaht anliegt, bleibt als Verbindung zum Rest des Schädelknochens bestehen. Beim Bohren ist darauf zu achten, weder die sagittalen Blutgefäße noch die Dura mater zu verletzen. Sobald die Kraniotomie durchgeführt ist, wird das Fenster mit einer gebogenen Pinzette vorsichtig nach medial aufgeklappt (Abb. 13).

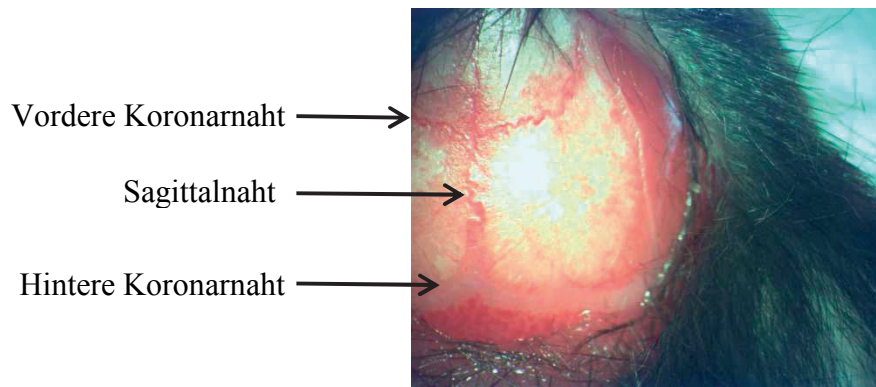


Abbildung 12: Freigelegter Schädelknochen

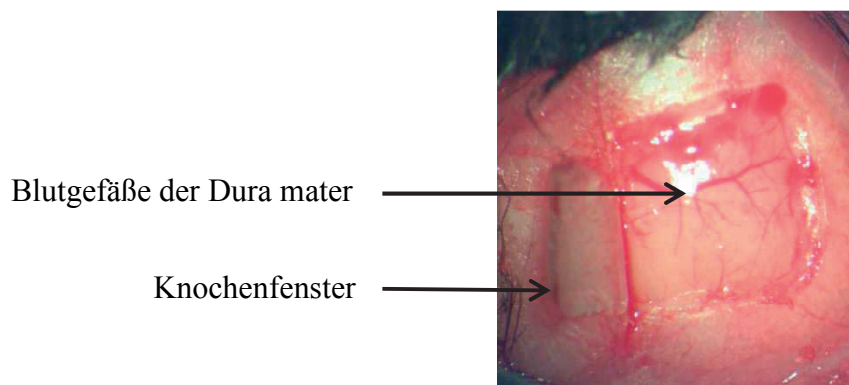


Abbildung 13: Eröffnetes Schädelfenster

Nun wird der Impaktor über der Maus in die exakte Position gebracht (Abb. 14). Dafür muss er mit der kompletten Aufsatzfläche plan in leichtem Kontakt mit der Dura mater aufliegen ohne diese einzudrücken. Gegebenenfalls muss der Impaktor an den Schrauben verstellt werden, damit der Bolzen sich im exakt rechten Winkel zur Hirnoberfläche befindet. Dieser Schritt ist sehr gewissenhaft auszuführen, da nur so ein vergleichbarer Schaden in jedem Tier induziert werden kann. Anschließend wird der Knopf am Gerät betätigt und der pneumatische Impakt mit folgenden Parametern ausgeführt:

Eindringtiefe: **1,0 - 1,5 Millimeter (mm)**

Durchmesser des Impaktors: **3 mm**

Aufprallgeschwindigkeit: **8 m/s**

Kontaktzeit: **150 Millisekunden (ms)**

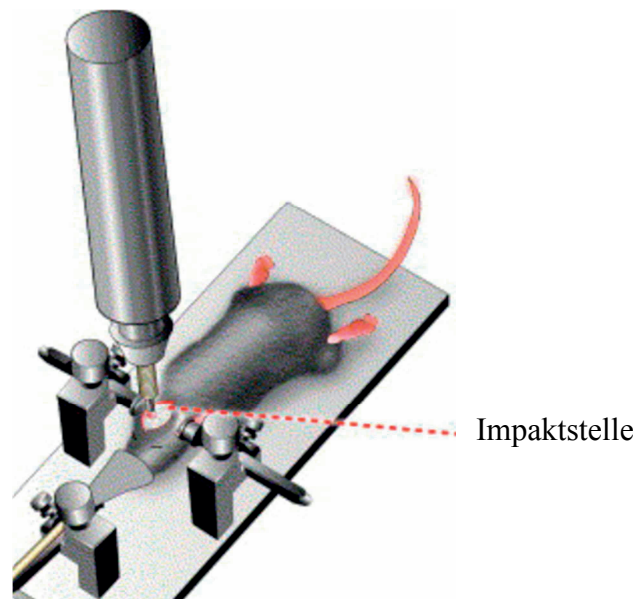


Abbildung 14: Schematische Darstellung des CCI-Operationssitus modifiziert nach Onyszchuk (236)

Direkt im Anschluss wird das Knochenfenster zugeklappt, damit das Hirnparenchym nicht infolge des Traumas rausquillt. Während man das Fenster mit Hilfe einer Pinzette fixiert, verschließt man es umgehend mit dem Gewebekleber. Dabei sollte stets darauf geachtet keine Haut, Haare oder Operationsbestecke festzukleben. Zum Schluss wird die Haut mit drei bis vier Knopfnähten sorgfältig verschlossen.

Während der gesamten Operationsdauer liegt die Maus auf einer Wärmematte (38 °C), um das Risiko einer Hypothermie zu minimieren. Aus diesem Grund wird das Tier auch unmittelbar nach der Operation für weitere 1,5 h in einen Inkubator verbracht. Bei 33 °C und 35 % Luftfeuchte kann es sich dort von der Narkose erholen.

4.5.2. Überwachung der physiologischen Parameter

Um vergleichbare Bedingungen zu gewährleisten, werden bei jedem Versuchstier die physiologischen Parameter während der ca. 15-minütigen Operationszeit überwacht. Im Rahmen des Narkoseprotokolls werden die Atmung visuell und die Herzfrequenz palpatorisch in kurzen Abständen kontrolliert. Die rektale Temperatur wird durchgängig mittels einer Temperatursonde gemessen (Abb. 11). Die perikranielle Temperatur wird vor und nach dem Impact mit Hilfe einer perikraniellen Temperatursonde überprüft, die dafür in den rechten Musculus temporalis gestochen wird.

4.5.3. Überwachung der Abbruchkriterien

Nach § 31 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1d TierSchVersV sind konkrete Abbruchkriterien zu benennen, die sobald sie eintreten zum unmittelbaren Abbruch des Experiments führen um starke Schmerzen Leiden und Schäden für das Versuchstier zu vermeiden (230). Dies betrifft sowohl den peri- als auch den postoperativen Zeitraum.

Im Zuge dessen werden alle Tiere vor Versuchsbeginn tierärztlich auf ihre physiologische Unversehrtheit hin begutachtet. Zeigen einzelne Mäuse Krankheitsanzeichen werden sie von der Studie ausgeschlossen. Intraoperativ werden die Tiere wie unter 4.5.2 beschrieben überwacht und nur nach ausbleibendem Schmerzreflex (siehe 4.4.) der Operation unterzogen. Treten während des Eingriffs starke Blutungen oder längere Apnoephasen auf, wird das Tier direkt in Narkose euthanasiert. Im Verlauf der postoperativen Phase werden die Tiere täglich begutachtet und / oder dem Neuroscore unterzogen. Hierbei führen starker Gewichtsverlust ($\geq 15\%$) in Kombination mit ausgeprägter Schmerzsymptomatik (Zähneknirschen, gestäubtes Fell, veränderte Mimik) und Verhaltensdefiziten (stark beeinträchtigte Lokomotion, Krämpfe, Stupor, eingeschränktes Putz- und Nestbauverhalten) zur Euthanasie der Tiere. Diese erfolgt jeweils in tiefer Narkose durch Exartikulation des Atlantookzipitalgelenks mit anschließender Durchtrennung des Rückenmarks.

4.6. Euthanasie

Am Ende des Versuches werden die Tiere euthanasiert, um die Hirne für weitere Analysen zu entnehmen. Dies geschieht unmittelbar nach Isofluran-Kurznarkose (1 min; 4 Vol. %) durch zervikale Dislokation und anschließende Abtrennung des Kopfes.

Zudem wird den Tieren die Schwanzspitze zur Nachgenotypisierung abgeschnitten und in 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt.

4.7. Hirnentnahme

4.7.1. Komplettentnahme mit Kryokonservierung

Nachdem der Kopf vom Rumpf getrennt wurde, eröffnet man die Kopfhaut sagittal mit einer Schere von caudal nach rostral. Anschließend führt man die Schere in das Foramen magnum ein und setzt einen kleinen Schnitt dorsal. Davon ausgehend bricht man vorsichtig den Schädelknochen nach lateral bis das Gehirn ganz freigelegt ist. Es ist immer darauf zu achten, dass die Dura mater sich beim Ablösen der Knochenteile nicht zu Strängen formiert, die das Gehirnparenchym zerschneiden.

Zuletzt durchtrennt man vorsichtig die ventral abgehenden Hirnnerven, bettet das Hirn (Abb. 15) für ca. 5 min in zuvor pulverisiertes Trockeneis und lagert es in einem Probenbeutel verpackt bis zur weiteren Prozessierung bei -30 °C.

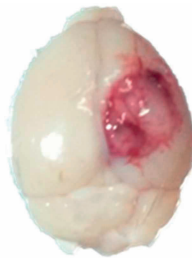


Abbildung 15: Aufsicht auf traumatisiertes Gehirn (Schadensareal in Rot)

4.7.2. Prozessierung in der Matrix

Manche Analysemethoden bedürfen keines gesamten Hirns sondern nur bestimmter Areale. Hierfür wird das Gehirn wie unter 4.7.1. beschrieben entnommen, allerdings wird es nicht in Trockeneis sondern in eine Gehirnmatrix gelegt, deren Fugen jeweils 1 mm Abstand zueinander aufweisen. Zuerst wird eine Rasierklinge in die Mitte des Schadens platziert. Zwei weitere werden jeweils 3 mm rostral bzw. caudal eingeschoben. Die daraus resultierenden 3 mm-breiten Transversalschnitte werden mit Hilfe eines Skalpells zunächst vertikal halbiert und die entstehenden Hälften dann horizontal geteilt, sodass vier Quadranten entstehen (Abb. 16).

Während die ventralen Quadranten verworfen werden, überführt man die beiden dorsalen in Kryogefäße, die vorübergehend in Flüssigstickstoff gelegt werden und anschließend bei - 80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert werden.

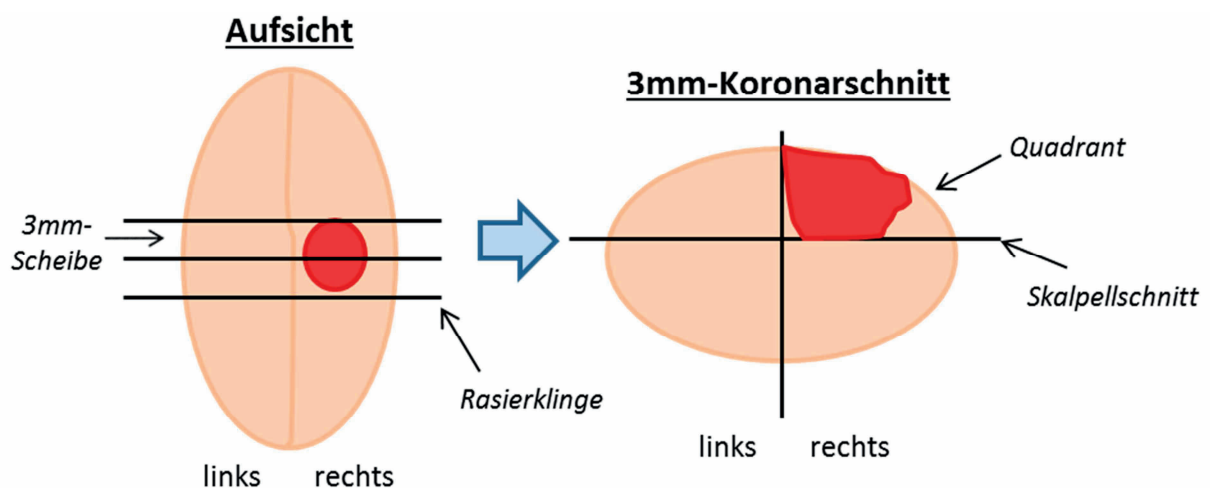


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Hirnprozessierung in der Gehirnmatrix
(Schadensareal in Rot dargestellt)

4.8. Kryostat

Um Material für histologische Färbungen zu erhalten, wird das Hirn in einem Kryostat bei -20 °C in sehr feine Scheibchen geschnitten. Hierzu wird das Hirn mit dem Kleinhirn nach unten mit Hilfe eines Einbettmediums auf dem Objektisch befestigt. Nachdem das Hirn genau im rechten Winkel zur Messerklinge positioniert wurde, umhüllt man es komplett mit Einbettmedium. Dadurch lässt es sich besser schneiden und die Gefahr, dass die Schnitte, insbesondere im Schadensbereich, einreißen, ist minimiert. Beginnend bei Bregma + 3,14 mm wird das Hirn von rostral nach caudal in 16 koronare Ebenen unterteilt, von denen jede 500 µm dick ist. Am Anfang jeder Ebene werden fünf Mal ein 10 Mikrometer (µm)-dicker Schnitt auf jeweils einen Objektträger aufgenommen. Zwischen Ebene 6 bis 9 und Ebene 10 bis 13 werden pro Ebene, anschließend an die 10 µm Schnitte 8 x 30 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese werden exakt aufeinander gestapelt, um dann analog zu 4.7.2. in Quadranten geteilt, in Kryogefäße gepackt und bei -80°C gelagert zu werden. So erhält man pro Hirn vier Quadranten (rostral und caudal jeweils einen ipsi- und einen kontralateralen), die zu molekularbiologischen Analysen verwendet werden können.

4.9. Histologische Färbung

4.9.1. Kresylviolett

Zur Quantifizierung des Hirnschadens benutzt man die Nissl-Färbung, mit der sich Nervengewebe darstellen lässt. Bei dieser nach Franz Nissl benannten Technik verwendet man Kresylviolett, das sich an basophile Strukturen wie die Desoxyribonukleinsäure (DNA) und die Ribonukleinsäure (RNA) anlagert (236, 237). Dadurch werden insbesondere die Nuklei und die Ribosomen der Neurone angefärbt, da diese Zellorganellen reich an Nukleinsäuren sind. Die zu erkennenden „Nissl-Schollen“ entsprechen dem rauen endoplasmatischen Retikulum, dessen Oberfläche mit Ribosomen besetzt ist. Die Ausläufer der Nervenzellen (Axone, Dendriten) werden aufgrund der Abwesenheit von Nuklei und der geringen Menge an rauem endoplasmatischen Retikulum nicht gefärbt.

Durchführung: Die Kresylviolett-Färbelösung wird wie in Tab. 5 beschrieben frisch angesetzt und durch einen Papierfilter filtriert. Die Schnitte werden für 30 min luftgetrocknet. Nach 2 min in 70 %-igen Ethanol, werden sie dann für 10 min in die Kresylviolett-Färbelösung getaucht. Durch zweimaliges kurzes Eintauchen in Aqua dest. wird zunächst überschüssige Farbe entfernt, um anschließend in einer aufsteigenden verkürzten Alkoholreihe (jeweils

zweimaliges schnelles Waschen in 70 und 96 %-igem Alkohol) die Schnitte zu entwässern. Die Fixierung erfolgt durch erst 5 min dann 2 min in Roti®-Histol. Zu Konservierungszwecken werden die Schnitte letztendlich mit Roti®-Histokitt und einem Deckgläschen versiegelt.

4.9.1.1. Bemessung des Schadensvolumen

In den mit Kresylviolett gefärbten Schnitten entspricht der gefärbte Teil dem vitalen Gewebe, der ungefärbte Teil dem infolge des CCI abgestorbenen Gewebe.

Mittels eines Mikroskops, einer Mikroskopie-Kamera und der Delta Pix InSight Software wird bei allen 16 Ebenen eines Hirns verblindet zunächst die Größe (= Fläche; A) beider Hemisphären ermittelt und im Anschluss die Fläche des vitalen Gewebes der rechten Hemisphäre. Subtrahiert man die Größe der gesunden Fläche von der rechten Gesamtfläche erhält man das Schadensareal für den jeweiligen Schnitt (Abb. 17).

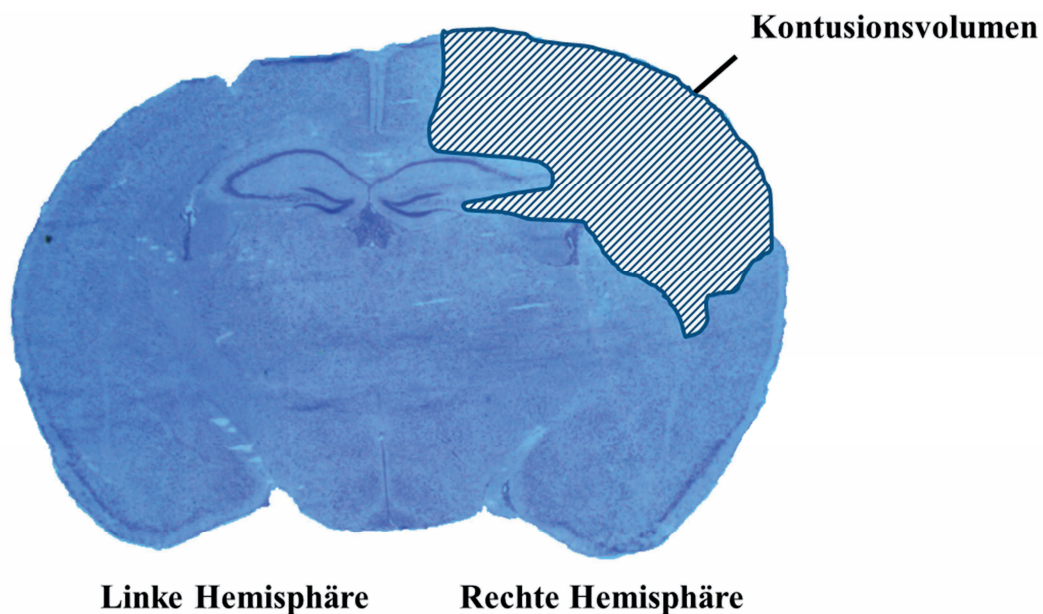


Abbildung 17: Kontusionsvolumenbestimmung am Nissl gefärbten Schnitt

Um das Kontusionsvolumen (V) in Kubikmillimeter (mm³) des kompletten Gehirns zu bestimmen, bedient man sich folgender Formel:

$$V = \sum_{1}^{16} A_x * 500\mu m$$

4.10. Motorfunktionsanalyse

Um eine Aussage darüber treffen zu können in welchem Ausmaß der zerebrale Insult Auswirkungen auf die motorische und teilweise neurologische Funktion hat, wird sich verschiedener Scoring-Systeme bedient, die im Folgenden erläutert werden. Hierbei ist es wichtig, alle Tiere vor Operationsbeginn und nach einer kurzen Adaptionszeit an die neue Umgebung, zu testen, um einen Basiswert zu ermitteln, aufgrund dessen man den Unterschied von prä- und postoperativem Status bestimmen kann. Der Basiswert, der bei der Motorfunktionsanalyse bestimmt wird, ist wichtig, da sowohl bei Auszucht- als auch bei Inzuchtstämmen physische und/oder kognitive Unterschiede zwischen den Individuen bestehen. Beim Neuroscore-System kann dies besonders bei genetisch veränderten Tieren aufgrund verschiedener Ursachen (Adipositas, genetisch bedingte sensomotorische Beeinträchtigungen) dazu führen, dass die zu den Gebieten Koordination und Balance zählenden Aufgaben nicht gemeistert werden können. Beim Rota-Rod besteht schon bei Inzuchtstämmen, die alle weitestgehend genetisch identisch sein sollten, eine große Variabilität der Leistungsfähigkeit. Dadurch ist es zum Teil ratsam die individuelle Differenz zwischen prä- und postoperativem Wert zu errechnen und für Analysezwecke zu benutzen, da hieraus am besten die Einwirkung des SHT auf das einzelne Tier zu erkennen ist und man somit die Vergleichbarkeit innerhalb einer inhomogenen Gruppe verbessert.

4.10.1. Neuroscore

Bei diesem Scoring-System werden hauptsächlich die neuromotorischen Fähigkeiten untersucht. Der *Neurological Severity Score* (NSS) (modifiziert nach Shohami (238)), kurz Neuroscore, setzt sich aus sechs verschiedenen Kategorien zusammen. Das Tier wird aus seinem Käfig genommen und direkt gewogen, um Gewichtsverluste auszuschließen, die durch stressbedingte Kot- und Urinausscheidungen während des Tests verursacht werden.

Im Nachfolgenden werden die Tests, die in Tab. 15 protokollarisch dargestellt sind, erläutert:

1. Verlassen des Kreises: Das Tier wird in die Mitte eines auf eine Plexiglasscheibe aufgemalten Kreises mit einem Durchmesser von 25 cm gesetzt und die Zeit gemessen bis das Tier mit beiden Vorderbeinen über den Rand des Kreises getreten ist.

2. Reflexe: Man klatscht die Hände über der Maus zusammen und beobachtet ob eine Schreckreaktion, meist in Form eines Zusammenzuckens, erfolgt.

3. Verhaltensdefizite: Überprüfung ob das Tier ein speziestypisches Erkundungsverhalten (Kopf in verschiedene Richtungen drehen, Vibrissenbewegung) zeigt und ob es fähig ist geradeauszulaufen (ggf. durch leichtes Anheben am Schwanz).

4. Koordination: Die Maus läuft nacheinander von rechts nach links über Balken von abnehmender Breite. Diese sind ca. 20 cm über dem Boden angebracht und eine Strecke von 50 cm muss überwunden werden (Abb. 18). Hierbei wird begutachtet, ob das Tier dazu in der Lage ist und, wenn ja, wie viele Fehlritte ihm dabei unterlaufen.

Läuft das Tier von rechts nach links, kann man die linke hintere Gliedmaße besser beurteilen als in der anderen Richtung. Da der CCI auf den rechten parietalen Cortex appliziert wurde, sind motorische Defizite auf der linken Seite zu erwarten, da die pyramidalen Bahnen von rostral nach caudal die Seite kreuzen (26).

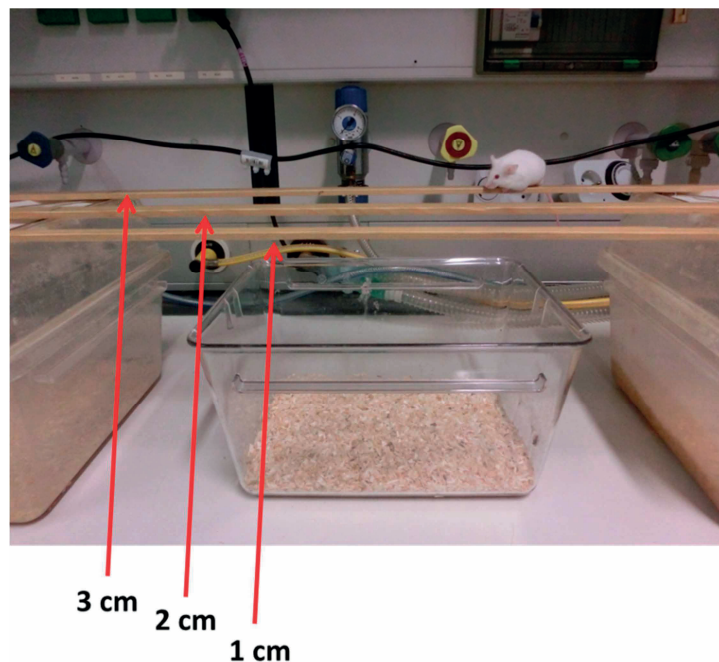


Abbildung 18: Neuroscore – Koordinations-Test

5. Balance: Die Maus wird zunächst auf einen quadratischen Stock gesetzt. Es wird beurteilt, ob die Maus sich für mind. 10 s mit allen vier Pfoten gleichzeitig auf oder an dem Stab festhalten kann oder nicht. Gleiches wird dann auf einem runden Stock wiederholt. Grundsätzlich finden die Tiere an dem quadratischen Stab mit seinen Kanten einfacher Halt als an dem runden Stab.

6. Motorische Defizite: Abschließend wird beurteilt inwiefern das Versuchstier in seiner motorischen Funktion beeinträchtigt ist. Der Schweregrad der Beeinträchtigung wird

aufgrund der vorab gezeigten Teilleistungen in Kombination mit dem etwaigen Auftreten einer Parese der linken Hintergliedmaße (1 Punkt) oder gar einer linksseitigen Hemiparese (2 Punkte) bewertet. Das besondere Augenmerk wird aus den bereits zuvor erwähnten Gründen auf die linke hintere Gliedmaße gelegt.

Somit erhält jedes Tier eine abschließende Gesamtpunktzahl, die sich aus der Summe der erreichten Punkte in jeder Kategorie zusammensetzt (Tab. 15). Je höher der Wert ist, desto schlechter die neuromotorische Funktion des Tieres.

Tabelle 15: Neuroscore-Protokoll

Tiernummer			
OP-Datum			

			PräOP	Tag 1
Datum und Uhrzeit:				
Gewicht [g]				
<u>Kategorie/Kriterium</u>	<u>Punkte</u>	<u>Erreichte Punktzahl</u>		
1. Verlassen des Kreises				
< 30s	0			
31-60s	1			
61-120s	2			
>120s	3			
2. Reflexe				
Schreckreaktion	vorhanden	0		
	abwesend	1		
3. Verhaltensdefizite				
Erkundungsverhalten	vorhanden	0		
	abwesend	1		
Geradeauslaufen	möglich	0		
	nicht möglich	1		
4. Koordination				
1 cm Balken	ohne Probleme, ≤ 2 Fehlritte	0		
	> 2 Fehlritte	1		
	läuft gar nicht; fällt runter	2		
2 cm Balken	≅ 1 cm Balken	0-2		
3 cm Balken	≅ 1 cm Balken	0-2		
5. Balance				
Quadratischer Stab	10s mit 4 Pfoten drauf gehalten	0		
	nicht erfüllt	1		
Runder Stab	10s mit 4 Pfoten drauf gehalten	0		
	nicht erfüllt	1		
6. Motorische Defizite				
	Abwesend	0		
	Tier geringgradig beeinträchtigt	1		
	Tier hochgradig beeinträchtigt	2		
Gesamtpunktzahl:				

4.10.2. Rota-Rod

Eine Möglichkeit die Motorfunktion zu überprüfen, ist das Rota-Rod (239, 240). Hierbei werden die Mäuse auf einen ca. 15 cm erhöhten rotierenden Stab gesetzt, der seitlich durch Plastikscheiben begrenzt ist. Dieser wird innerhalb von 5 min von 4 Umdrehungen / min auf 40 Umdrehungen / min beschleunigt. Das Gerät misst die Zeit von Beginn der Beschleunigung an bis die Maus von der Rolle runter auf einen Hebel fällt, der durch den Aufprall runtergedrückt wird und somit automatisch die Zeit stoppt (Abb. 19). Vor den eigentlichen Testungen werden die Tiere trainiert. Dazu werden sie beim allerersten Mal vorerst nur auf den Stab gesetzt, ohne dass dieser sich bewegt und dann an zwei aufeinander folgenden Tagen je zwei Mal auf dem Rota-Rod laufen gelassen. Am Morgen des Operationstages werden die Mäuse dann noch einmal getestet. An jedem weiteren Testtag werden dann zwei Mal / d ihre motorischen Fähigkeiten auf dem Rota-Rod analysiert. Zu Auswertungszwecken wird der Maximalwert der beiden Werte hinzugezogen, da er die bestmögliche Leistung unter den postoperativen Bedingungen widerspiegelt.

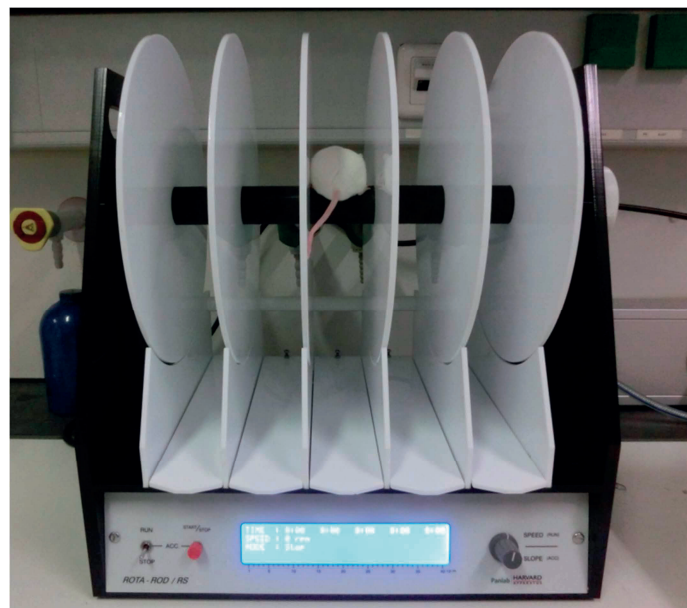


Abbildung 19: Rota-Rod

Je länger die Tiere auf dem Rota-Rod laufen desto besser sind ihre Koordination und ihre motorischen Fähigkeiten. Nach SHT ist die Fähigkeit der Tiere mit ihren Pfoten an der rotierenden Stange Halt zu finden minimiert, weswegen sie bereits nach kurzer Zeit herabfallen (241).

4.11. mRNA-Extraktion

Um das Expressionsmuster einiger Neurotrophine, ihrer Rezeptoren sowie ausgewählter Inflamationsmarker in der qRT-PCR zu analysieren, muss man zuvor die messenger RNA (mRNA) aus dem Gewebe extrahieren. Der Unterschied zwischen der mRNA und der genomischen DNA besteht darin, dass bei der mRNA alle Introns durch Splicing herausgeschnitten sind und die verbleibenden Exons somit von den Ribosomen in Proteine translatiert werden können. mRNA entsteht durch Transkription aus DNA und tritt auf sobald das Gen aktiv ist (242).

Für die Extraktion wird das RNeasy Mini Kit verwendet, bei der entweder die im Kryostat gewonnenen Trimmquadranten oder die in der Matrix gewonnenen Quadranten (jeweils der caudale ipsilaterale Part) eingesetzt werden. Zunächst wird das Gewebestück in 0,9 ml Qiazol gegeben. Die monophasische Lösung dient der Lyse, der Inhibition von RNAsen und zur Entfernung eines Teils der zellulären DNA. Nach Zugabe einer Edelstahlkugel wird das Gewebe 2 x 1 min bei 20 Hertz im Mastermill homogenisiert und anschließend 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun werden nacheinander zuerst 100 µl gDNA Eliminator, der zu einer weiteren Elimination von genomischer DNA führt, dann 180 µl Chloroform zugegeben und jeweils 15 s auf dem Vortexer gut durchmischt. Letzteres ist sehr wichtig, damit die gewünschte Phasentrennung nach der Zentrifugation auftritt. Die Proben werden nach erneuter 2-minütiger Inkubation bei 4 °C und 12000 x g für 15 min zentrifugiert. Dadurch entstehen drei Phasen: die obere farblose wässrige Phase, in der sich die RNA befindet, die mittlere milchige Interphase, die die DNA beinhaltet und die untere rote Phase, in der die Proteine gelöst sind. Zur weiteren Aufreinigung werden die ca. 600 µl der obersten Phase vorsichtig abpipettiert und in 600 µl 70 %-igem Ethanol resuspendiert. Der Alkohol führt zu einer verbesserten Bindung der mRNA an die Silikatmembran der Mini-Spin-Säulen, auf die jetzt in zwei Durchgängen jeweils 600 µl des Gemisches gegeben wird und anschließend für 15 s bei 8000 x g abzentrifugiert wird. Der Durchlauf, in dem sich Verunreinigungen wie z.B. Phenole befinden, wird dabei verworfen. Um die an die Membran gebundene RNA weiter von Kontaminationen zu reinigen, wird zunächst mit 700 µl RWT-Puffer, anschließend mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Dies geschieht jeweils für 15 s bei 8000 x g. Es folgt ein Waschgang mit 500 µl RPE-Puffer für 2 min bei 8000 x g. Der Durchlauf wird nach jedem Waschgang verworfen. Damit wirklich alles außer der RNA von der Membran entfernt wird, zentrifugiert man abschließend nochmal für 1 min bei 13500 x g.

Als letzter Schritt folgt nun die Elution mit 30 µl RNase freiem Wasser, das direkt auf die Membran pipettiert und anschließend 1 min bei 8000 x g in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß abzentrifugiert wird. Das Wasser führt dazu, dass die RNA von der Säule gelöst wird und im Eluat enthalten ist.

4.11.1. Konzentrationsbestimmung der mRNA

Nach der Extraktion wird die mRNA-Konzentration (c in µg/µl) jeder Probe mit Hilfe des Photometers bestimmt. Hierzu wird 1 µl des Eluats eingesetzt. Das Photometer misst die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Ersteres repräsentiert das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, letzteres das von Proteinen. Der Quotient aus OD_{260} und OD_{280} gibt den Reinheitsgrad der Probe an und sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen. Da die OD_{260} einer RNA-Menge von ca. 40 µg/µl, lässt sich anhand der folgenden Formel die Konzentration der einzelnen Proben ausrechnen:

$$c = OD_{260} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 40 \text{ µg/µl}$$

Das Absorptionsmaximum von RNA liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm und eine optische Dichte von 1,0 entspricht hier einer Konzentration von 40 µg/ml. Die Proben werden anschließend bei -80 °C weggefroren.

4.12. cDNA-Synthese

Um die mRNA-Expression mittels qRT-PCR untersuchen zu können, muss die mRNA zuerst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden (reverse Transkription). Dies erfolgt mit Hilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kit. Hierfür werden 0,5 µg der mRNA mit 2 µl gDNA Wipeout Buffer, mit RNase-freiem Wasser auf 14 µl aufgefüllt und 8 min bei 42 °C inkubiert. Dies führt dazu, dass jegliche genomische DNA eliminiert wird. In einem Mastermix werden alle Bestandteile, die für die reverse Transkription notwendig sind zusammengemischt: 1 µl der Reversen Transkriptase, 4 µl Puffer und 1 µl Primermix. Dieser Mix wird dann der mRNA aus der Eliminations-Reaktion beigegeben und im Anschluss 30 min bei 42 °C inkubiert. Die Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase und bindet an das Poly-A-Ende der mRNA und fängt an aus den im Mastermix enthaltenen Nukleotiden enzymatisch einen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Hierbei dient jedes RNA-Molekül als Matrize, sodass anschließend genauso viele cDNA-Moleküle gebildet werden, wie RNA-Moleküle vorhanden waren. Zum Schluss wird durch eine 3-minütige Inkubation des Gemischs bei 95 °C das Enzym inaktiviert, sodass es zu keiner weiteren cDNA-Synthese mehr kommen kann. Die neu gebildete cDNA wird nun 1:1 mit Wasser verdünnt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Um einem Abbau der mRNA entgegen zu wirken ist es wichtig, die Proben zwischen den einzelnen Schritten immer auf Eis zu stellen.

4.13. PCR

Die PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen (Amplifikation) durch eine *in vitro* durchgeführte Replikation der DNA. Schon kleinste Mengen lassen sich damit eindeutig nachweisen.

Man benötigt nachfolgende Bestandteile:

- DNA-Matrize
- Thermische DNA-Polymerase
- 2 spezifische Primer
- Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)
- Puffer
- Magnesiumchlorid (MgCl_2)

Es wird zumeist 1 μl DNA eingesetzt und als Template bezeichnet. Es stammt entweder aus der cDNA-Synthese (s. 4.12.) oder aus der DNA-Extraktion aus Gewebe durch das Tissue-to-PCR Kit (s. 4.2.2.1.).

Die Polymerase wird aus thermophilen Bakterien (z.B. *Thermus aquaticus*) isoliert, was ihr den Vorteil verschafft bei 95 °C nicht so leicht zu denaturieren, weshalb sie nur einmal zu Beginn der Reaktion beigegeben werden muss.

Die Primer sind für jedes Produkt spezifisch (s. Tab. 7). Es gibt jeweils einen der vom 5' - zum 3'-Ende verläuft und einen Gegenläufigen. Sie werden mit forward (F) und reward (R) oder sense (S) und anti-sense (A) bezeichnet. Die dNTPs, Adenosin- (dATP), Guanin- (dGTP), Cytosin- (dCTP) und Thymidintriphosphat (dTTP) dienen als Substrate für die Polymerase. Aus ihnen wird die amplifizierte DNA aufgebaut. Der Puffer schafft die optimalen äußeren Bedingungen für die enzymatische Reaktion und Magnesium-Ionen sind für die Funktion der Polymerase essenziell. Die PCR-Reaktion läuft in einem Thermocycler (LightCycler® 480) ab, der anhand eines zuvor eingestellten Programms die verschiedenen Temperaturen für die jeweilige Dauer der Zyklusphase automatisch reguliert.

Jede PCR umfasst 20-40 Zyklen, von denen jeder einzelne gleich aufgebaut ist:

1. Denaturierung: Hierbei werden bei 95 °C die Wasserstoffbrücken zwischen den Einzelsträngen aufgelöst.
2. Primer-Hybridisierung (Annealing): Nachdem der Doppelstrang geöffnet ist, können nun die Primer an ihren spezifischen, komplementären DNA-Bereich anlagern. Je nach Primer

muss hier eine andere Temperatur gewählt werden (s. Tab. 16), da diese abhängig vom jeweiligen Guanin-/Cytosingehalt zwischen 40 und 70 °C variieren kann.

3. DNA-Synthese (Elongation): Die Primer fungieren nun als Ansatzstellen für die Polymerase, die ausgehend vom 3'-Ende in Richtung des 5'-Endes den DNA-Strang mit komplementären dNTPs verlängert.

Im darauffolgenden Zyklus werden auch die neugebildeten Doppelstränge denaturiert und elongiert, sodass man im Idealfall mit einer Verdopplung der gewünschten DNA-Sequenz pro Zyklus rechnen kann (243). Das Produkt wird zum Schluss in einer Gelelektrophorese detektiert und die entstehenden Banden beurteilt (s. 4.2.2.1. und 4.2.3.1.).

4.13.1. qRT-PCR

Um eine Aussage über die Quantität eines Produkts geben zu können, kommt die Methode der qRT-PCR zum Einsatz. Mit einer Software wird in Echtzeit (*real-time*) die absolute Menge der amplifizierten DNA mittels Fluoreszenz-Emission gemessen. Dafür benutzt man entweder fluoreszierende Farbstoffe oder fluoreszierende Sonden, die durch eine Lichtquelle angeregt werden, um dann ein Signal zu emittieren. SYBR-Green ist ein Fluoreszenz-Farbstoff, der unspezifisch jede Doppelstrang-DNA bindet (244). Ein weiteres Markierungssystem beruht auf dem Einsatz von Hybridisierungs-Sonden (245). Die Sonden sind Oligonukleotide und können in Donor- und Akzeptor-Fluorochrom unterteilt werden. Sie binden in kurzem Abstand an der gesuchten DNA-Sequenz und der Donor gibt nach der Anregung durch Licht einen Teil der Energie an den Akzeptor ab. Diese Energie wird dann als Fluoreszenzsignal detektiert. Welches System für welches Target eingesetzt wird, ist in Tab. 16. aufgeführt. Zusätzlich sind die Nukleotid-Sequenzen der Hybridisierungs-Sonden in Tab. 7 gelistet.

Tabelle 16: PCR Assays und Annealingtemperaturen

Target	Assay	Annealingtemperatur
BDNF	DyNAmo™ ColorFlash Probe qPCR	55° C
IL-1 β	LightCycler® 480 Probes	55 °C
IL-6	LightCycler® 480 Probes	55 °C
iNOS	LightCycler® 480 Probes	55 °C
NGF A	DyNAmo™ ColorFlash Probe qPCR	55 °C
p75NTR (mRNA)	LightCycler® 480 Probes	55 °C
NTRK1	Absolute Blue qPCR Sybrgreen	58 °C
NTRK2	Absolute Blue qPCR Sybrgreen	58 °C
PPIA	KapaProbeFast qPCR	55 °C
Sortilin (mRNA)	Maxima Probe qPCR	55 °C
TNF α	Absolute Blue qPCR Sybrgreen	62 °C

Trägt man die Intensität des Fluoreszenzsignals graphisch gegen die Anzahl der PCR-Zyklen auf, entsteht eine typische Kurve, die in drei Abschnitte unterteilt werden kann:

Die erste Phase ist durch einen langsamen Anstieg gekennzeichnet, da nur wenig Template zur Verfügung steht. In der darauffolgenden zweiten Phase kommt es bei optimaler Verteilung von DNA, Polymerase und Primern zu einem exponentiellen Wachstum, das in der dritten Phase stagniert. Es bildet sich ein Plateau, da die Produkte sich nun gegenseitig behindern und es somit zu keinem weiteren Anstieg des Fluoreszenzsignals mehr kommen kann. In der zweiten Phase ermittelt die LightCycler® Software den sogenannten Crossingpoint (CP), der den Zyklus anzeigt, in dem das Fluoreszenzsignal signifikant einen Schwellenwert übertrifft, der zuvor als Hintergrund definiert wurde. Der CP-Wert wird vom Computer mit einer Standardkurve verglichen, um ihn mit einer DNA-Konzentration zu assoziieren.

Alle Proben werden im Doppelansatz bestimmt und der Mittelwert aus beiden Werten wird für die Analyse genommen. Zusätzlich wird in jedem Versuch ein sogenanntes Housekeeping-Gen bestimmt. Dies kennzeichnet sich dadurch aus, dass es kontinuierlich exprimiert wird und keinen Schwankungen unterworfen ist. In dieser Arbeit wird hierfür

Peptidylprolyl Isomerase A (*Ppia*) eingesetzt, das keine Regulierung nach CCI erfährt (246). Alle Targets einer Probe werden dann auf den *Ppia*-Wert der gleichen Probe normalisiert. Alle Proben werden auf eine 96-well Platte pipettiert, mit Klebefolie verschlossen, zentrifugiert und dann gemessen. Zusätzlich werden zur Kontrolle immer vier Negativproben (Wasser) pipettiert.

Je nachdem welches Detektionssystem zum Einsatz kommt, variiert das Pipettierschema geringfügig (Tab. 17).

Tabelle 17: Pipettierschemata für PCR

SYBR-Green	Hybridisierungssonden
5 µl SYBR-Green	5 µl Kit-spezifischer Mastermix
0,25 µl Primer F bzw. S	0,25 µl Primer F bzw. S
0,25 µl Primer R bzw. A	0,25 µl Primer R bzw. A
3,5 µl H ₂ O	0,5 µl FL-Sonde
1 µl Target DNA	0,5 µl Cy5-Sonde
	2,5 µl H ₂ O
	1 µl Target DNA

4.14. Western Blot

Der Western Blot wird auch Immunoblot genannt und dient dem Nachweis von Proteinen (247, 248). Bei dem Verfahren werden die Proteine erst via Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen (blotting). Auf der Trägermembran können sie dann anhand verschiedener Detektionsverfahren sichtbar gemacht und quantifiziert werden.

4.14.1. Proteinaufbereitung

Zuerst müssen die Proteine aus den Gewebestücken extrahiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden für die Analyse die rostralen ipsilateralen (Trimm-) Quadranten eingesetzt.

Die Proben werden mit ca. 150 µl des lysierenden RIPA-Puffers versetzt, gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die enthaltenen Detergenzien lösen die Quartär- und Tertiärstrukturen der Eiweiße auf. EDTA fungiert als Komplexbildner und der Proteaseinhibitor verhindert den enzymatischen Abbau der Proteine. Um den Aufschluss zu verbessern, werden die Proben nach Zugabe einer Edelstahlkugel für 2 x 1 min bei 20 Hertz im Homogenisator zerkleinert und nochmal 20 min auf Eis inkubiert bevor sie für 20 min bei 14000 x g zentrifugiert werden. Der Überstand wird in ein neues vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und kann bei -80 °C gelagert werden.

4.14.1.1. Messung der Proteinkonzentration

Da die Proteinkonzentrationen der Proben schwanken können ist es wichtig, die genaue Proteinmenge jeder einzelnen Probe mit dem Lowry DC Protein Assay zu bestimmen.

Zuerst werden je 0,5 µl einer Standardreihe mit definierten Proteinmengen (0; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 µg / µl) auf eine 96-well Platte aufgetragen, dann je 0,5 µl einer 10-fachen Verdünnung der zu messenden Proben. Standard sowie Proben werden im Doppelansatz bestimmt und anschließend der Mittelwert zur Analyse herangezogen. 25 µl eines Gemisches aus 50 Teilen Reagent A und 1 Teil Reagent S sowie 250 µl Reagent B werden jedem Well beigemischt. Dies führt zu einer enzymatischen Reaktion bei der ein lila Farbstoff abhängig von der in der Probe enthaltenen Proteinmenge gebildet wird. Nach einer lichtgeschützten 12-minütigen Inkubationszeit werden die Proben mit dem Glomax®-Detektionssystem photometrisch ausgewertet.

Abschließend wird in Excel mit Hilfe der ermittelten Standardkurve die Proteinmenge in $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ ermittelt. Dabei wird auch die eingesetzte Verdünnung mit einbezogen. Aufgrund der Daten kann man nun die Menge an Lysat berechnen, die man für die jeweilige Proteinmenge in μg braucht.

4.14.2. Elektrophorese

Um die Proteine ihrer Größe entsprechend aufzutrennen, benutzt man die SDS-PAGE Methode. Der eingesetzte Ladepuffer enthält Natriumdodecylsulfat (SDS), das zu einer Aufspaltung der Proteine in ihre Untereinheiten führt, und β -Mercaptoethanol, das als Reduktionsmittel fungiert und somit die Disulfidbrücken löst. Bindet SDS an die Eiweißstrukturen, führt dies zur Bildung eines negativ geladenen Komplexes und dazu, dass bei allen Proteinen ein gleiches Masse-/Ladungs-Verhältnis vorliegt, damit sie im elektrischen Feld folglich größenabhängig und ladungsunabhängig zur Anode wandern. Je nachdem, ob man kleinere oder größere Proteine detektieren will, kann man unterschiedliche Gele benutzen. Um z.B. BDNF zu analysieren empfiehlt sich der Einsatz eines kommerziellen NuPAGE Gradienten-Gels (5-12 %), da sich in dem engeren Netz besonders kleine Moleküle besser auftrennen lassen. Bei größeren Molekülen spricht der wirtschaftliche Aspekt für die kostengünstigeren selbstgegossenen SDS-Gele. Während die Proteine im NuPAGE-Gel anhand eines sich verkleinernden Gradienten wandern und aufgespalten werden, unterteilt man das SDS-Gel in ein Sammel- und ein Trenngel. Im Sammelgel stapeln sich die Proteine an der Grenze zum Trenngel, um dort ihrer Größe entsprechend unterschiedlich schnell und demnach weit im elektrischen Feld zu wandern. Dieser Effekt beruht darauf, dass Glycin im nahezu neutralen Sammelgel als Zwitterion vorliegt, im basischen Trenngel jedoch als Anion.

Zur Herstellung werden die Gele zwischen zwei Glasplatten gegossen. Zuerst das Trenngel, das mit Isopropanol überschichtet wird, um die Oberfläche zu glätten. Nachdem es auspolymerisiert ist, wird das Sammelgel darauf gegossen und ein Kamm eingesteckt, um die Taschen zum Befüllen zu generieren. Grundbestandteil ist Acrylamid. Ammoniumpersulfat (APS) dient als Radikalbildner und beeinflusst neben Tetramethylethyldiamin (TEMED) die Polymerisierung.

Tabelle 18: Pipettierschema für 2 SDS-Gele 10 %

Bestandteile	Trenngel 10 %	Sammelgel
H ₂ O	4 ml	2,5 ml
Sammelgelpuffer	-	1,25 ml
Trenngelpuffer	1,25 ml	-
Acrylamid	1,65 ml	1,25 ml
APS	75 µl	75 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Vor Beladung des Gels werden jeweils 50 µg Protein mit SDS-Ladepuffer im Verhältnis von 1:5 versetzt und für 5 min bei 95 °C zur Denaturierung inkubiert. Zusätzlich werden 6 µl Pre-Staining Marker in die erste Tasche und 5 µl Magic Marker in die letzte Tasche pipettiert. Ersterer dient der Orientierung während des Laufes, da er bei der Auftrennung farbliche Banden hinterlässt, wohingegen Letzterer mittels der fluoreszierenden sekundären Antikörper angefärbt werden kann und bei der Detektion des Blots von Vorteil ist. Das Gel wird in eine Elektrophoresekammer eingespannt, die mit Laufpuffer aufgefüllt ist. Der Laufpuffer (249) und die Parameter für die Gelelektrophorese unterscheiden sich je nach verwendetem Gelsystem: Die kommerziellen NuPage-Gele brauchen mit dem kommerziellen NuPage MOPS Puffer ca. 80 min mit 150 Volt (V), währenddessen die selbstgegossenen Gele mit dem selbsthergestellten Laufpuffer ca. 70 min bei 0,03 Ampere für eine vollständige Auftrennung der Eiweiße benötigen.

4.14.3. Western Blot

Nun werden die Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (247). Dies erfolgt wiederum im elektrischen Feld. Die Eiweiße haften dem zufolge fest an der Membran und können mittels Antikörpern detektiert werden. Zuerst wird dafür ein „Sandwich“ gebaut, das später in den Tankblot eingespannt werden kann. Hierzu werden alle benötigten Bestandteile erst in Blotpuffer getränkt und dann in einer Kompressionskassette wie in Abb. 20 zusammengebaut.

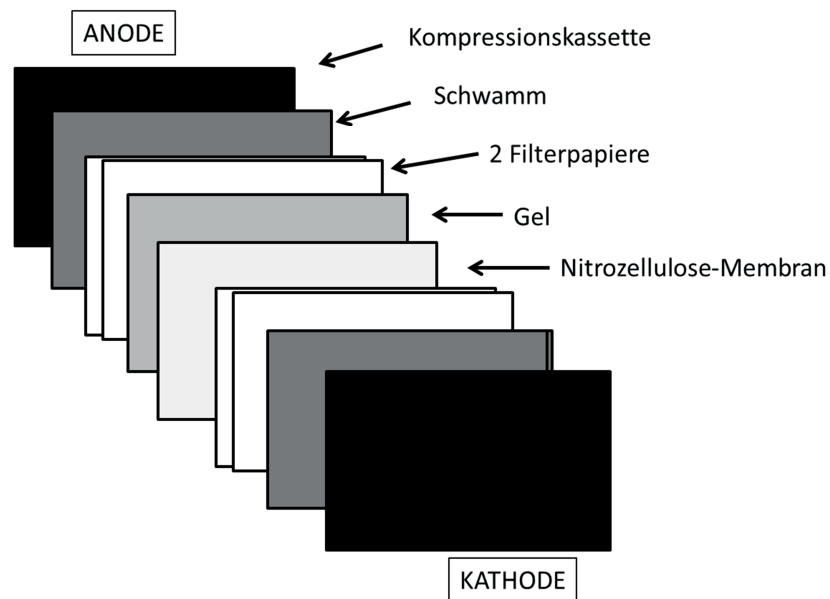


Abbildung 20: Blot Aufbau

Es ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen zwischen den Lagen entstehen, da an diesem Punkt der Übertrag nicht funktionieren kann und sogenannte Blotblasen entstehen. Bei 380 Milliampere dauert der Transfer 85 min. Zur Überprüfung, ob er erfolgreich war, wird die Membran mit Ponceau S angefärbt. Der Farbstoff bindet reversibel an die positiv geladene Aminogruppe der Proteine und kann anschließend leicht mit Wasser wieder abgespült werden.

Um unspezifische Bindungen zu blockieren wird die Membran für 1 h mit 5 % Magermilch gelöst in Tris-Hydroximethyl-Aminomethan gepufferter Salzlösung (TBS) bei Raumtemperatur inkubiert. Der Primärantikörper, der an die Zielstruktur bindet, wird dann über Nacht bei 4 °C auf die Membran gegeben. Alle primären Antikörper sind in den in Tab. 8 angegebenen Konzentrationen in 2,5 % Magermilch (in TBST) oder in reinem TBST (TBS + Tween-20) gelöst.

Am nächsten Tag wird die Membran zwei Mal für mind. 10 min in TBST gewaschen und anschließend 1 h bei Raumtemperatur, abgedunkelt mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Dieser muss so gewählt werden, dass er sich gegen die Spezies, aus der der primäre Antikörper gewonnen wurde, richtet. Die Sekundärantikörper sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, der bei bestimmter Wellenlänge in rot (680 nm) oder grün (800 nm) leuchtet (Tab. 9). Bevor die Membran ausgewertet wird, wäscht man sie ein letztes Mal für 10 min in TBST. Alle Inkubationen und Waschschritte erfolgen auf dem Schüttler, damit sichergestellt ist, dass die Antikörper gleichmäßig binden und beim Waschen alles Überschüssige entfernt wird.

Auf der gleichen Membran kann man nach ausgiebigem Waschen in TBST mit mind. 3-maligem Wechseln der Waschlösung, ein weiteres Protein nach dem gleichen Prozedere detektieren, sofern die zu erwartende Bande nicht mit einer bereits vorhandenen größenmäßig interferiert.

4.14.4. Auswertung

Die Membranen werden anschließend im Odyssey Infra-rot Fluoreszenz Detektionssystem ausgemessen. Die quantitative Auswertung erfolgt mit Hilfe der Image Studio Lite Software. Hierbei misst der Computer die Intensität der Bande des zu analysierenden Proteins sowie die Bande des Kontrollproteins Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) der gleichen Probe. Im Anschluss wird der Quotient aus beiden gebildet, um die relative Protein-Expression angeben zu können. Diese Ratio wird benutzt, um eventuelle Pipettierfehler auszugleichen. GAPDH entspricht in seiner Funktion den Housekeeping-Genen bei der PCR (s. 4.13.1), ein Protein, dessen Expression stabil gegenüber endo- und exogenen Veränderungen ist.

4.15. Studiendesign

In den folgenden Unterabschnitten wird anhand von Zeitstrahlen ein Überblick über den zeitlichen Ablauf der einzelnen Teilstudien sowie eine tabellarische Übersicht über die einzelnen Studiendesigns gegeben.

Der Experimentator war in allen Bereichen, die subjektiv manipulierbar wären (Operation, Injektionen, neuromotorische Tests, Färbung und volumetrische Auswertung) verblindet gegenüber dem Genotyp bzw. der Gruppenzugehörigkeit der einzelnen Versuchstiere. Die Randomisierung der Tiere auf die unterschiedlichen Gruppen wurde durch eine außenstehende, nicht in das Experiment eingebundene Person nach dem Zufallsprinzip durchgeführt.

4.15.1. Zeitreihe zur Protein-Expression

Zur Überprüfung der Protein-Expression von p75NTR, Sortilin und α 2-Spectrin wurden 50 männliche C57Bl6-N (> 25 g Körpergewicht (KGW)) eingesetzt. 30 von ihnen wurden einem CCI unterzogen, wobei die Eindringtiefe 1,5 mm betrug. Die restlichen 10 Tiere bekamen kein SHT und werden im Folgenden als nativ bezeichnet. Jeweils 10 der operierten Mäuse wurden 1 d, 3 d, 5 d nach Trauma euthanasiert und die Hirne aller Tiere wurden nach der Entnahme in der Gehirnmatrix prozessiert (s.4.7.2.). Zusätzlich wurden die Quadranten in Cortex und Hippocampus getrennt und die Proben bei -80 °C gelagert. Aus den rostralen ipsilateralen Cortex-Proben wurde die mRNA extrahiert und untersucht. Die Ergebnisse sind unter 2.3. dargestellt.

Die caudalen ipsilateralen Cortex-Proben wurden nun im Rahmen dieser Dissertation aufbereitet und im Western Blot Verfahren untersucht. Pro Zeitpunkt wurden fünf Proben, deren mRNA-Expressions-Werte dem Mittelwert der p75NTR-mRNA-Expression am nächsten lagen, ausgewählt und analysiert.

4.15.2. Rolle von p75NTR nach SHT

Um die Rolle von p75NTR nach SHT genauer zu untersuchen, wurden drei eigenständige Versuche durchgeführt, in denen verschiedene Zielparameter im Fokus standen. Bei allen drei Versuchen wurden adulte (> drei Monate), männliche und weibliche p75NTR-Mäuse

eingesetzt und bei der Auswertung KO- mit WT-Tieren verglichen. Die Eindringtiefe des CCI wurde auf 1,0 mm festgesetzt.

4.15.2.1. Rolle von p75NTR 24 h post SHT (Histologie)

Zur Analyse des Effekts von p75NTR auf die Ausbildung des Sekundärschadens in der Frühphase nach SHT wurden 16 p75NTR Mäuse einem CCI unterzogen (Tab. 19). 24 h nach der Operation wurden die Tiere euthanasiert, die Hirne entnommen und kryokonserviert.

Zielparameter: Kontusionsvolumen (Kresylviolett-Färbung)

Tabelle 19: Gruppendesign p75NTR 24 h (Histologie)

Gruppe	Genotyp	CCI/nativ	Überleben	Anzahl
A	KO	CCI	24 h	8
B	WT	CCI	24 h	8
Gesamtzahl				16

4.15.2.2. Rolle von p75NTR 24 h post SHT (Molekularbiologie)

Für diesen Teilversuch wurden 14 Tiere eingesetzt, um auf molekularbiologischer Ebene den Kurzzeiteffekt von p75NTR nach SHT zu untersuchen. Zehn Tiere erhielten ein Trauma, fünf blieben nativ (Tab. 20). Die Hirne wurden 24 h nach CCI entnommen und in der Gehirnmatrix prozessiert.

Zielparameter: mRNA-Expression

Proteinanalyse

Tabelle 20: Gruppendesign p75NTR 24 h (Molekularbiologie)

Gruppe	Genotyp	CCI/nativ	Überleben	Anzahl
A	KO	CCI	24 h	5
B	WT	CCI	24 h	5
C	WT	Nativ	-/-	4
Gesamtzahl				14

4.15.2.3. Rolle von p75NTR 5 d post SHT

In diesem letzten Teilversuch zur Untersuchung der Rolle von p75NTR in der Spätphase nach SHT wurden 26 p75NTR Mäuse eingesetzt. 20 von ihnen bekamen ein SHT induziert, sechs blieben nativ (Tab. 21). Die Hirne wurden 5 d nach OP entnommen, kryokonserviert und zu einem späteren Zeitpunkt im Kryostat geschnitten.

Zielparameter: Kontusionsvolumen (Kresylviolett-Färbung)

mRNA-Expression

Motorfunktionsanalyse (NSS und Rota-Rod; Abb. 21)

Gewichtsentwicklung

Tabelle 21: Gruppendesign p75NTR 5 d

Gruppe	Genotyp	CCI/nativ	Überleben	Anzahl
A	KO	CCI	5 d	10
B	WT	CCI	5 d	10
C	KO	Nativ	-/-	3
D	WT	Nativ	-/-	3
Gesamtzahl				26

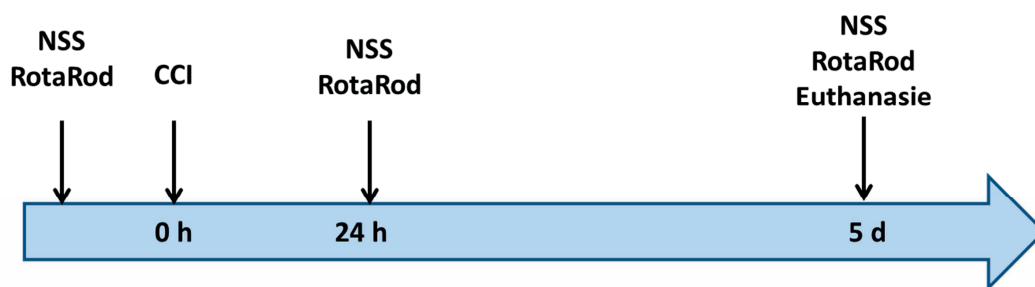


Abbildung 21: Studiendesign p75NTR 5 d

4.15.3. Effekt der pharmakologischen Inhibition des p75NTR 24 h post SHT

In diesem Versuch soll der Effekt einer Inhibition des p75NTR durch einen pharmakologischen Inhibitor TAT-Pep5 analysiert werden. 33 männliche C57Bl6-N Mäuse (> 21g KGW) wurden in drei Gruppen randomisiert (s. Tab. 22). Die Tiere wurden entweder mit einer niedrigen (1 μ M) oder einer hohen (10 μ M) Dosis TAT-Pep5 behandelt. Dazu

wurde zunächst 6 h nach Trauma eine Menge von 300 µl des Inhibitors als Bolus intravenös (i.v.) in die Schwanzvene appliziert und um den Wirkspiegel aufrecht zu halten, wurden 12 h nach OP nochmals 500 µl subkutan (s.c.) injiziert (Abb. 22). Im Folgenden wird die Gruppe mit der niedrigen Dosis mit LD (englisch: *low-dose*), die mit der hohen mit HD (englisch: *high-dose*) abgekürzt. Als Kontrollgruppen dienen Tiere, die nach dem gleichen Injektionsschema mit einem TAT-Kontrollpeptid (TAT-Ctrl) behandelt wurden. 24 h nach CCI wurden die Tiere euthanasiert, die Hirne entnommen und im Kryostat prozessiert. Die Eindringtiefe des CCI beträgt 1,5 mm.

Zielparameter: Kontusionsvolumen (Kresylviolett-Färbung)

mRNA-Expression

Motorfunktionsanalyse (NSS)

Gewichtsentwicklung

Tabelle 22: Gruppendesign TAT-Pep5 24 h

Gruppe	Injektion	CCI/nativ	Überleben	Anzahl
A	TAT-Pep5 LD (1 µM)	CCI	24 h	11
B	TAT-Pep5 HD (10 µM)	CCI	24 h	11
C	TAT-Ctrl (10 µM)	CCI	24 h	11
Gesamtzahl				33

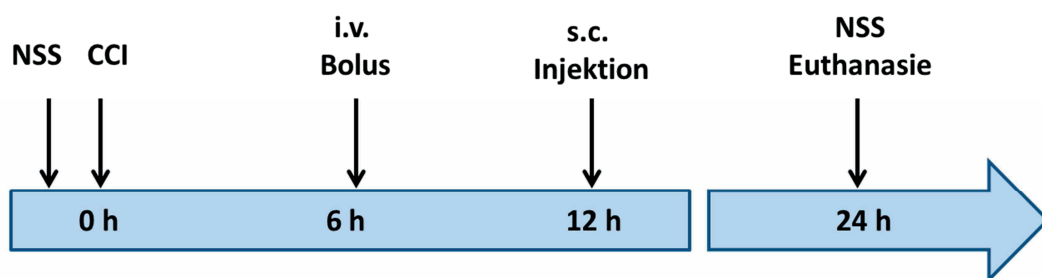


Abbildung 22: Studiendesign TAT-Pep5 24 h

4.15.3.1. Ansetzen der TAT-Pep5-/ TAT-Ctrl-Lösungen zum Injizieren

TAT-Pep5 und TAT-Ctrl wurden von der Firma PANATecs GmbH protein analytics synthetisiert und als Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml geliefert. Ausgehend von diesen Stammlösungen wurden Verdünnungen mit isotonomischer 0,9 %-iger Kochsalzlösung (NaCl) als Vehikel angesetzt und den Mäusen injiziert.

1.) TAT-Pep5

- Molekulargewicht: 3403.7
- 10 μ M-Lösung: 170 μ l der TAT-Pep5-Stammlösung + 4830 μ l NaCl 0,9 %
- 1 μ M-Lösung: 170 μ l der 10 μ M-Lösung + 4830 μ l NaCl 0,9 %

2.) TAT-Ctrl

- Molekulargewicht: 1559.9
- 10 μ M-Lösung: 160 μ l der TAT-Ctrl-Stammlösung + 4840 μ l NaCl 0,9 %

4.15.4. Effekt von TAT-Pep5 auf die Neurotoxizität von Propofol nach SHT

Um die Rolle von p75NTR bei der Entstehung der eingangs erwähnten Neurotoxizität des Anästhetikums Propofol näher zu beleuchten, wurde in diesen zwei Experimenten untersucht, ob die pharmakologische Inhibition des Rezeptors in Kombination mit der Gabe von Propofol nach SHT eine Auswirkung auf den Sekundärschaden und ausgewählte Zelltodparameter hat. Die Eindringtiefe des CCI beträgt bei diesen Versuchen 1,5 mm.

4.15.4.1. Ansetzen der Propofol-Lösung zum Injizieren

Die benötigte Lösung mit einer Propofol-Konzentration von 10 mg / kg KGW wurde hergestellt, indem man 1 %-iges Propofol mit der Trägersubstanz Lipofundin in einem 1:1 Verhältnis mischt. Daraus resultiert ein Injektionsvolumen von 2 μ l / g KGW.

4.15.4.2. Histologie nach 72 h

24 männlichen C57Bl6-N Mäusen (> 21 g KGW) wurde ein experimentelles SHT appliziert. Nach 23 h und 45 min wurde ihnen i.v. TAT-Pep5 (10 μ M) appliziert. 15 min später wurde den Tieren in die andere Schwanzvene Propofol oder Lipofundin injiziert (Tab. 23; Abb. 23). 72 h nach OP wurden die Tiere euthanasiert, die Hirne entnommen, kryokonserviert und im Kryostat geschnitten.

Zielparameter: Kontusionsvolumen (Kresylviolett-Färbung)

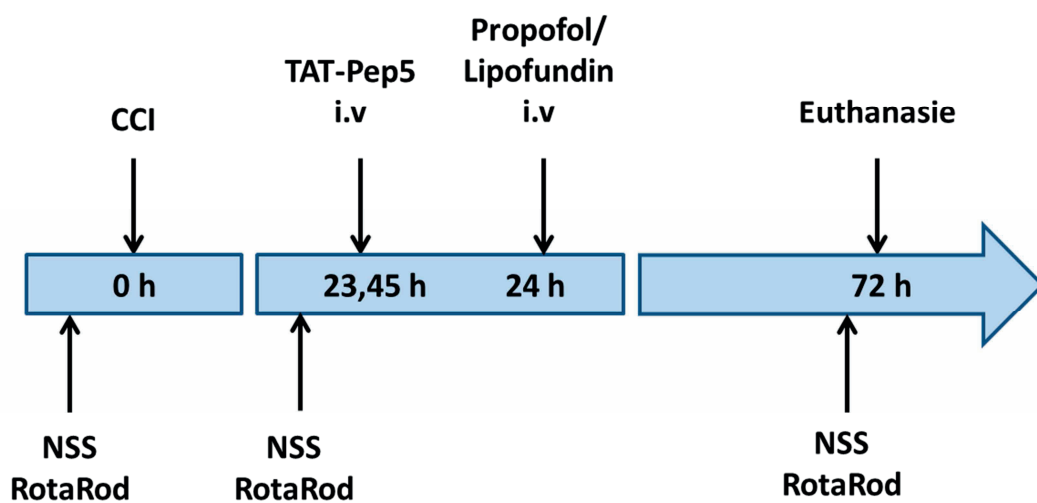
mRNA-Expression

Motorfunktionsanalyse (NSS und Rota-Rod)

Gewichtsentwicklung

Tabelle 23: Gruppendesign TAT-Pep5 / Propofol 72 h (Histologie)

Gruppe	1. Injektion	2. Injektion	CCI/nativ	Überleben	Anzahl
A	TAT-Pep5 (10 µM)	Propofol (10 mg / kg KGW)	CCI	72 h	12
B	TAT-Pep5 (10 µM)	Lipofundin	CCI	72 h	12
Gesamtzahl					24

**Abbildung 23: Studiendesign TAT-Pep5 / Propofol 72 h**

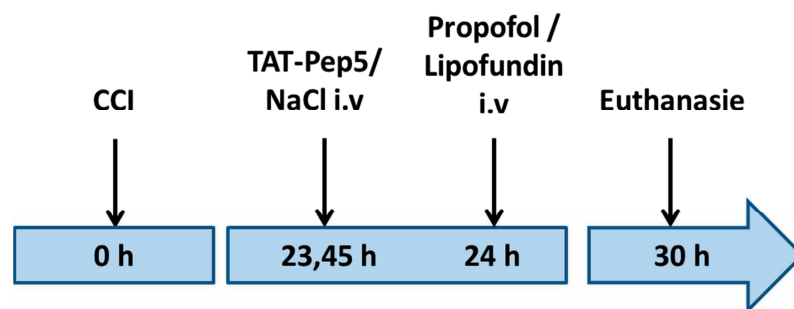
4.15.4.3. Proteinanalyse nach 30 h

Um die Fragestellung unter 4.15.6. besser beantworten zu können wurden weitere neun männliche C57Bl6-N (> 21g KGW) Mäuse operiert (Tab. 24). Ziel dieser Teilstudie war es Zelltodmarker auf Proteinebene zu untersuchen. Das Injektionsschema entspricht dem in 4.15.4.2. vorgestellten. Allerdings wurden die Tiere bereits 6 h nach Injektion, dementsprechend 30 h nach CCI (Abb. 24), euthanasiert. Die Hirne wurden in der Gehirnmatrix in die vier oben beschriebenen Quadranten unterteilt und bei -80 °C eingefroren.

Zielparameter: Proteinanalyse

Tabelle 24: Gruppendesign TAT-Pep5 / Propofol 30 h (Proteinanalyse)

Gruppe	1. Behandlung	2. Behandlung	CCI/nativ	Überleben	Anzahl
A	TAT-Pep5 (10 µM)	Propofol (10 mg / kg KGW)	CCI	30 h	3
B	NaCl (0,9 %)	Propofol (10 mg / kg KGW)	CCI	30 h	3
C	NaCl (0,9 %)	Lipofundin	CCI	30 h	3
Gesamtzahl					9

**Abbildung 24: Studiendesign TAT-Pep5 / Propofol 30 h (Proteinanalyse)**

4.15.5. Rolle des Sortilin-Rezeptors nach SHT

Um die Funktion des p75NTR-Co-Rezeptors Sortilin näher zu beleuchten, wurden Versuche an Sortilin KO-Mäusen durchgeführt. Die Auswirkungen des Verlusts dieses Rezeptors auf den Sekundärschaden nach SHT wurden unmittelbar (24 h) und nach etwas längerem Überleben (5 d) untersucht. Das Studiendesign richtet sich im Aufbau nach den Versuchen, die mit den p75NTR Tieren durchgeführt wurden. Bei allen drei Versuchen wurden adulte (> drei Monate), männliche und weibliche Sortilin-Mäuse eingesetzt und bei der Auswertung KO- mit WT-Tieren verglichen. Die Eindringtiefe des CCI beträgt bei diesen Versuchen 1,0 mm.

4.15.5.1. Rolle von Sortilin 24 h post SHT (Histologie)

Zur Analyse des Effekts von Sortilin auf die Ausbildung des Sekundärschadens in der Akutphase nach SHT wurden 20 Sortilin-Mäuse einem CCI unterzogen (Tab. 25).

Zielparameter: Kontusionsvolumen (Kresylviolett-Färbung)

Tabelle 25: Gruppendesign Sortilin 24 h (Histologie)

Gruppe	Genotyp	CCI/nativ	Überleben	Anzahl
A	KO	CCI	24 h	10
B	WT	CCI	24 h	10
Gesamtzahl				20

4.15.5.2. Rolle von Sortilin 24 h post SHT (Molekularbiologie)

Für diese Teilstudie wurde zehn Tieren ein experimentelles SHT zugefügt und weitere sieben Tiere wurden als Nativkontrolle mitgeführt (Tab. 26). Die Tiere wurden 24 h nach Operation euthanasiert. Das Hirn wurde in die beiden Hemisphären geteilt und anschließend Cortex und Hippocampus jeder Seite als Proben zur Analyse weggefroren.

Zielparameter: mRNA-Expression explizit im kortikalen Gewebe

Tabelle 26: Gruppendesign Sortilin 24 h (Molekularbiologie)

Gruppe	Genotyp	CCI/nativ	Überleben	Anzahl
A	KO	CCI	24 h	5
B	WT	CCI	24 h	5
C	KO	Nativ	-/-	3
D	WT	Nativ	-/-	4
Gesamtzahl				17

4.15.5.3. Rolle von Sortilin 5 d post SHT

Um die Auswirkung des fehlenden Rezeptors in einem etwas längeren Zeitraum nach CCI zu untersuchen, wurden 20 weibliche Mäuse einem CCI unterzogen. Zusätzlich wurden sechs Mäuse als Nativkontrollen mitgetestet (Tab. 27). 5 d nach experimentellem SHT euthanasierte man die Tiere. Die entnommenen Hirne wurden auf Trockeneis kryokonserviert und anschließend im Kryostat geschnitten.

Zielparameter: Kontusionsvolumen (Kresylviolett-Färbung)

mRNA-Expression

Motorfunktionsanalyse (NSS und Rota-Rod; Abb. 25)

Gewichtsentwicklung

Tabelle 27: Gruppendesign Sortilin 5 d

Gruppe	Genotyp	CCI/nativ	Überleben	Anzahl
A	KO	CCI	5 d	10
B	WT	CCI	5 d	10
C	KO	Nativ	-/-	3
D	WT	Nativ	-/-	3
Gesamtzahl				26

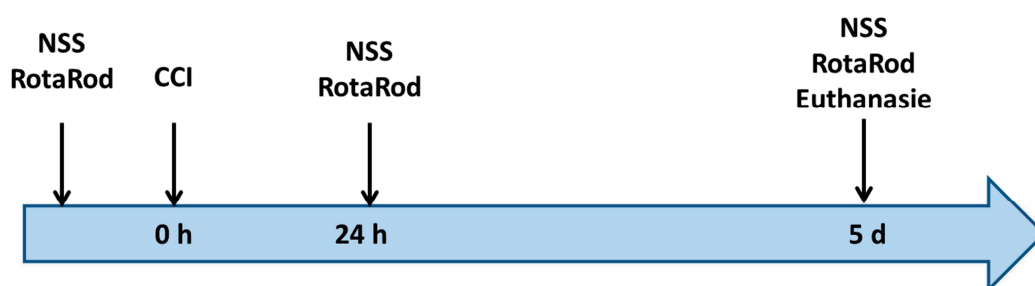


Abbildung 25: Studiendesign Sortilin 5 d

4.16. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe der Sigma Plot 12.5 Software. Auch die graphischen Darstellungen wurden mit diesem Programm angefertigt. Alle Ergebnisse sind in Form von Balkendiagrammen dargestellt unter Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung. Von statistischer Signifikanz wird ausgegangen, wenn der p-Wert $< 0,05$ liegt. In den Graphen wird folgende Kennzeichnung für die Unterteilung des Signifikanzniveaus eingesetzt:

- 1 Sternchen (*) steht für einen p-Wert $< 0,05$
- 2 Sternchen (**) entsprechen einem p-Wert $< 0,01$
- 3 Sternchen (***) symbolisieren einen p-Wert $< 0,001$

Die Daten sind mittels des Shapiro-Wilk Tests auf Normalverteilung untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Großteil nicht normalverteilt ist. Der statistische Vergleich der einzelnen Gruppen erfolgte daher durch den Mann-Whitney-U-Test, der keine Normalverteilung der Werte voraussetzt. Bei mehreren Zeitpunkten (z.B. Tag 1 und Tag 5) wurden immer nur die beiden verschiedenen Gruppen pro Zeitpunkt verglichen. Bei multiplem Testen wurde die Bonferroni-Holm-Korrektur angewendet. Die Auswertung der Protein-Expression in der Zeitreihe wurde sofern die Daten normalverteilt waren via One Way ANOVA ansonsten mittels eines ANOVA on Ranks Test durchgeführt, die des TAT-Pep5 + Propofol 30 h mittels One Way ANOVA. Beides anschließend nach Bonferroni korrigiert.

Obwohl die Daten, da sie nicht normalverteilt sind, korrekterweise als Boxplots dargestellt werden müssten, wurden sie zur besseren Übersicht sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in zugehörigen den Publikationen (25,94) anhand von Balkendiagrammen visualisiert.

4.17. Akkreditierung

Die CCI-Operationen wurden von meiner Kollegin Dr. med. Anne Sebastiani durchgeführt, da ich die Applikation des Impaktors krankheitsbedingt nicht optimal ausführen kann und somit die Reproduzierbarkeit des SHT nicht gewährleistet ist. Die PCR-Läufe wurden von meiner Kollegin Dana Pieter aus demselben Grund pipettiert. Aus logistischen Gründen übernahm mein Kollege Tobias Hirnet die i.v.-Injektionen.

5. Ergebnisse

Im Folgenden sind die Ergebnisse der unter 4.2. und 4.15. beschriebenen Untersuchungen dargestellt. Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung anhand von Balkendiagrammen dargestellt.

5.1. Verifizierung der *knock-out* Mäuse

5.1.1. p75NTR

Proben der Tiere (KO und WT) aus den unter 4.15.2. beschriebenen Versuchen wurden im Western Blot Verfahren mit einem Antikörper gegen den p75NTR untersucht. Der Antikörper bindet im transmembranösen bzw. zytoplasmatischen Teil des p75NTR und hat keine Spezifikation für die Neurotrophin-Bindungsstelle, sodass er alle p75NTR-Isoformen detektiert. In beiden Genotypen konnte eine vergleichbare Expression des p75NTR-Proteins nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die mRNA-Expression des p75NTR im nativen Gehirn unterscheidet sich in den einzelnen Genotypen der p75NTR Mäuse. Ausgehend vom WT kommt es zu einer 49,8 %-igen Reduktion der Expression in HE-Tieren, wohingegen keine *p75ntr* mRNA in KO-Tieren detektiert werden kann (Abb. 26) (WT: $1,34 \times 10^{-3} \pm 4,89 \times 10^{-4}$; HE: $6,75 \times 10^{-4} \pm 5,59 \times 10^{-5}$; KO: $0,0 \pm 0,0$).

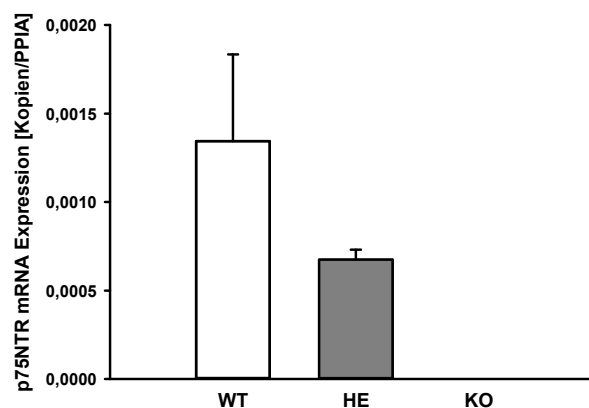


Abbildung 26: *p75ntr* mRNA-Expression in den unterschiedlichen p75NTR-Genotypen

Auch in den Mäusen, die in den unter 4.15.2. beschriebenen Versuchen eingesetzt wurden, zeigt sich dasselbe Resultat (s. 5.3.4).

5.1.2. Sortilin

Bei den nativen Sortilin-KO-Tieren aus 4.15.5.3. kann im Gegensatz zu den nativen Sortilin-WT-Tieren keine Bande mit der für Sortilin typischen Größe von 95 kDa im Western Blot detektiert werden. Eine schwache Bande bei ca. 85 kDa sieht man nur im KO-Tier (Abb. 27).

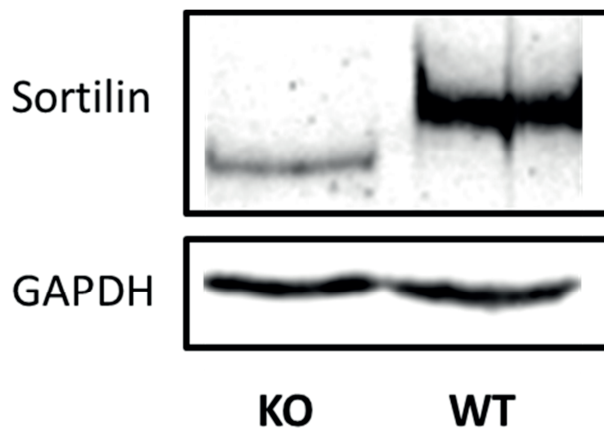


Abbildung 27: Western Blot Analyse zur Verifizierung des Sortilin-KO

5.2. Zeitreihe zur Protein-Expression von p75NTR, Sortilin und α 2-Spectrin

Weiterhin wurde überprüft, ob die Ergebnisse der kortikalen mRNA-Expression des p75NTR und des Sortilin-Rezeptors aus der in unserem Labor durchgeführten Zeitreihe (s. 2.3.) auch auf Proteinebene zu übertragen sind. Zusätzlich wurde die Protein-Expression des bei Zelluntergang entstehenden 145 kDa / 150 kDa-großen α 2-Spectrin-Spaltfragments (250) mittels Western Blot untersucht. Es wurden jeweils 50 μ g Protein eingesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse der densitometrischen Analyse mit Hilfe der Image Studio Lite Software jeweils in % nativ. Alle Werte wurden gegen GAPDH normalisiert.

5.2.1. Protein-Expression p75NTR

Die p75NTR-Expression ist 24 h nach CCI um 51,5 % im Vergleich zum nativen Grundzustand gestiegen (nativ: $100,0 \pm 21,4$; 1d: $151,5 \pm 30,4$; $p = 0,032$). Nach weiteren 4 d besteht noch eine um 16,0 % erhöhte Expression (5d: $116,0 \pm 32,9$; $p = 0,548$) (Abb. 28).

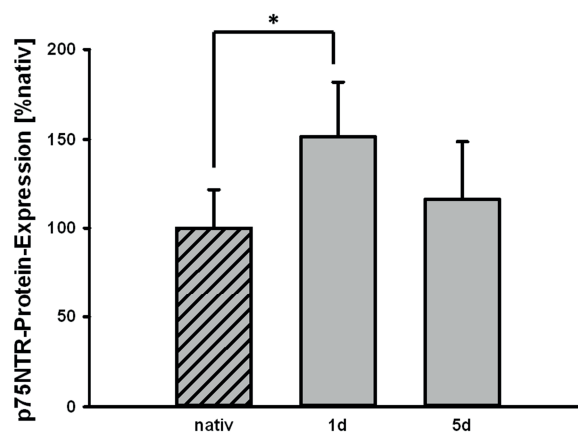


Abbildung 28: p75NTR-Protein-Expression an Tag 1 und 5 nach CCI in % nativ

5.2.2. Protein-Expression Sortilin

1 d nach experimentellem SHT kann man einen signifikanten 42,2 %igen Anstieg der Sortilin-Expression erkennen (nativ: $100,0 \pm 15,5$; 1d: $142,2 \pm 28,8$; $p = 0,042$). 5 d nach dem operativen Eingriff ist der Wert wieder ähnlich dem nativen Ausgangswert (5 d: $108,6 \pm 28,8$; $p = 1,000$) (Abb. 29).

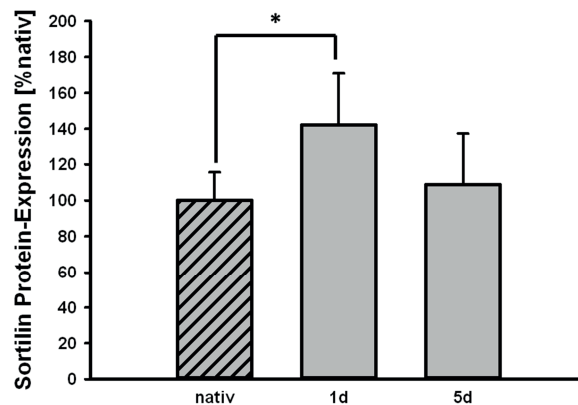


Abbildung 29: Sortilin-Protein-Expression an Tag 1 und 5 nach CCI in % nativ

5.2.3. Protein-Expression $\alpha 2$ -Spectrin-Spaltfragment (145 kDa / 150 kDa)

Calpain induziert die Spaltung der $\alpha 2$ -Untereinheit des submembranösen Zytoskelettproteins $\alpha 2$ -Spectrin. Das daraus resultierende Fragment hat eine Größe von 145 kDa / 150 kDa und kann als Zelltodmarker angesehen werden. Im Vergleich zum Nativtier kommt es zu einer um 414,0 % (nativ: $100,0 \pm 23,2$; 1d: $514,0 \pm 86,6$; $p = 0,016$) erhöhten Expression des 145 kDa / 150 kDa-Spaltfragments, die auch 5 d nach SHT noch um 317,3 % gesteigert ist (5 d: $417,3 \pm 130,4$; $p = 0,016$) (Abb. 30).

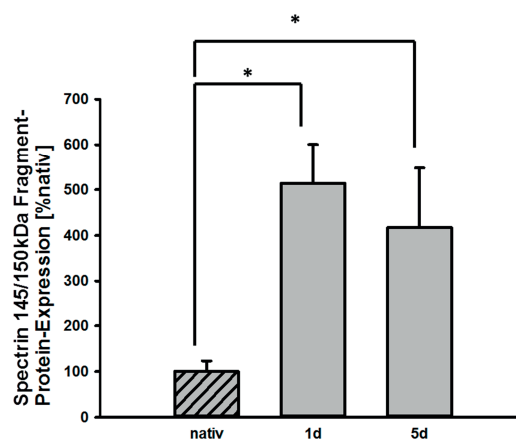


Abbildung 30: $\alpha 2$ -Spectrin-Fragment-Protein-Expression an Tag 1 und 5 nach CCI in % nativ

5.3. Einfluss einer genetischen Defizienz des p75NTR nach SHT

Im Folgenden werden die Ergebnisse dargestellt, die bei den unter 4.15.2. vorgestellten Versuchen erhoben wurden

5.3.1. Motorfunktionsanalyse

5.3.1.1. Neuroscore

Bei der Analyse des Neuroscores werden die an Tag 1 und Tag 5 nach CCI erhobenen Punktzahlen mit den Werten verglichen, die die Tiere vor der OP erreicht haben. 1 d (WT: $-8,1 \pm 3,3$; KO: $-7,2 \pm 2,0$; $p = 0,468$) und 5 d nach CCI (WT: $-6,5 \pm 3,1$; KO: $-6,5 \pm 2,9$; $p = 1,000$) zeigen KO-Tiere und ihre WT-Wurfgeschwister eine ähnliche postoperative Beeinträchtigung im Neuroscore (Abb. 31).

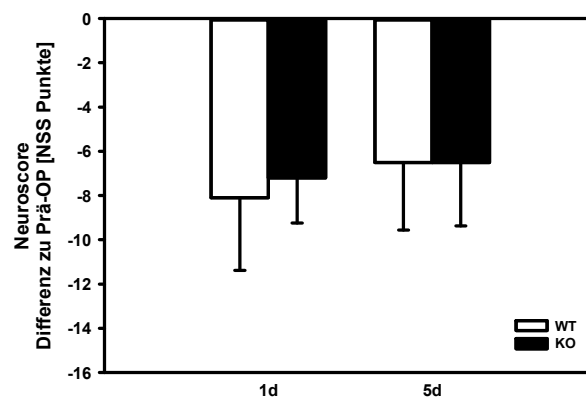


Abbildung 31: Neuroscore p75NTR 1d und 5 d

5.3.1.2. Rota-Rod

Vergleicht man die Zeit, die die Tiere sich 1 Tag bzw. 5 Tage nach CCI auf dem Rota-Rod halten können mit dem präoperativ erfassten Wert, stellt sich heraus, dass die Verschlechterung der motorischen Funktion bei den KO-Tieren (1d: $-38,4 \pm 25,22$; 5d: $-28,1 \pm 21,1$) geringer als bei den WT-Tieren (1d: $-72,1 \pm 33,1$; 5d: $-42,1 \pm 41,45$) ausfällt. An Tag 1 ist dieser Unterschied signifikant (1d: $p = 0,045$; 5d: $p = 0,472$) (Abb. 32).

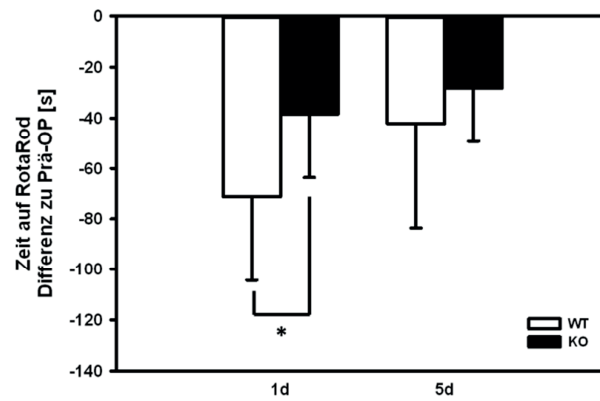


Abbildung 32: Rota-Rod Analyse p75NTR 1 d und 5 d

5.3.2. Gewichtsentwicklung

Die Analyse der Gewichtsentwicklung der Tiere nach CCI in % des präoperativen Ausgangsgewichts ergibt, dass sie 24 h nach der OP im Mittel bis zu 11 % ihres KGW verlieren jedoch im Verlauf der Zeit bis zu Tag 5 nach CCI wieder an Gewicht zulegen.

Nach 24 h haben die KO-Tiere signifikant weniger Gewicht verloren als ihre WT-Wurfgeschwister (WT: $-11,6 \pm 3,1$; KO: $-5,6 \pm 4,0$; $p = 0,004$). Dieser Unterschied besteht auch an Tag 5 als Trend noch (WT: $-7,2 \pm 5,2$; KO: $-2,6 \pm 5,2$; $p = 0,054$) (Abb. 33).

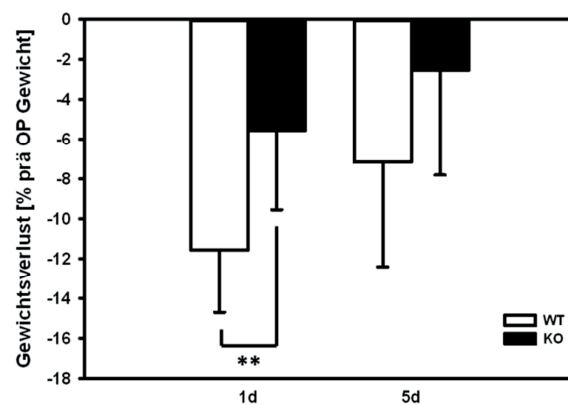


Abbildung 33: Gewichtsentwicklung p75NTR 1 d und 5 d

5.3.3. Kontusionsvolumen

Das anhand Kresylviolett-gefärbter Kryoschnitte ausgemessene Läsionsvolumen (ungefärbtes Areal s. Abb. 35 und 35) unterscheidet sich zwischen KO- und WT-Tieren signifikant. Nach 24 h kommt es bei den KO-Tieren zu einer Reduktion des Schadensareals um 21,2 % (WT: $46,3 \pm 7,3$; KO: $36,4 \pm 4,7$; $p = 0,007$).

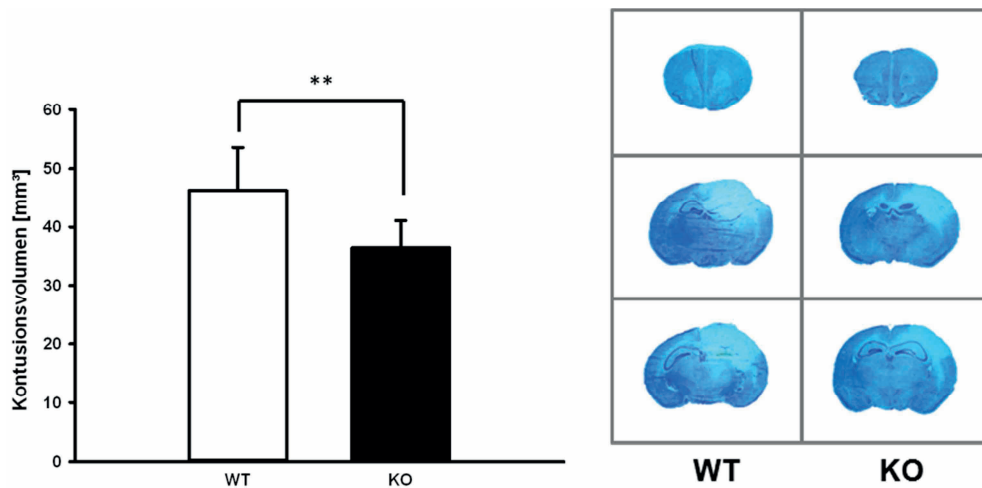


Abbildung 34: Kontusionsvolumen p75NTR 24 h (Nissl-Färbung)

5 d nach experimentellem SHT ist der Schaden im KO-Tier um 29,2 % (WT: $24,1 \pm 6,7$; KO: $17,0 \pm 5,2$; $p = 0,031$) kleiner als im WT-Tier.

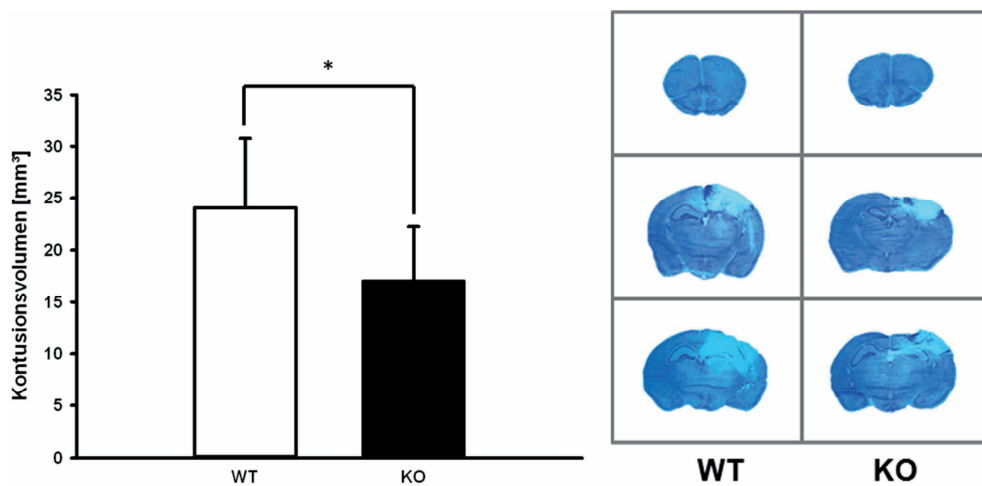


Abbildung 35: Kontusionsvolumen p75NTR 5 d (Nissl-Färbung)

5.3.4. mRNA-Expression

Die mRNA wurde wie unter 4.11. beschrieben aus den caudalen ipsilateralen Quadranten extrahiert. Alle mittels qRT-PCR erhobenen Werte (Kopien / *Ppia*) werden als % nativ WT ausgedrückt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen sind auf die erste Nachkommastelle gekürzt.

5.3.4.1. Inflammation

Nach experimentellem SHT kommt es zu einem Anstieg der Zytokine Interleukin 1 beta (*il-1 β*), *il-6*; und *tnfa* sowie der induzierbaren Stickstoffsynthase (*inos*) im perikontusionalen Gewebe. Dieser Anstieg erfolgt in beiden Genotypen sowohl 24 h als auch 5 d nach CCI. Nach 24 h ist kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu erkennen (Abb. 36). Allerdings wird nach 5 d *il-6* in den KO-Tieren signifikant weniger exprimiert als in den WT-Wurfgeschwistern ($p = 0,031$). Die anderen Inflamationsparameter zeigen im Trend eine vergleichbare Regulation nach 5 d (Abb. 37).

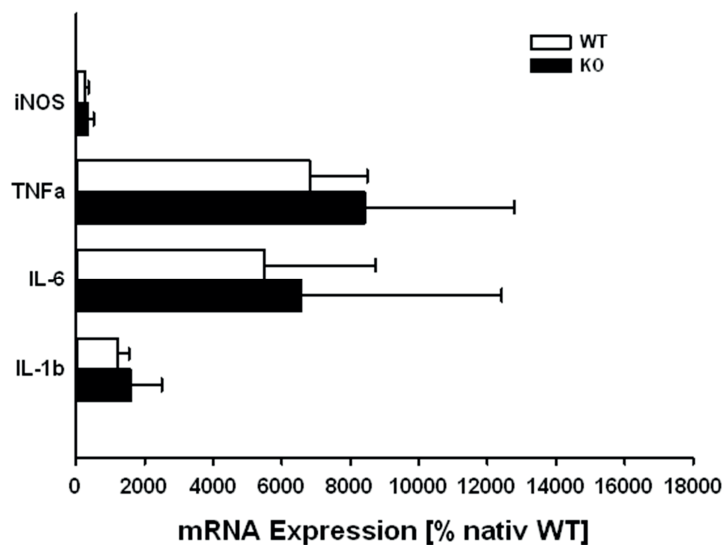


Abbildung 36: Inflamationsparameter p75NTR 24 h

(*il-1 β* : WT = 1216,1 ± 321,5; KO = 1588,8 ± 912,9; $p = 0,690$ / *il-6*: WT = 5494,1 ± 3235,5; KO = 6563,0 ± 5825,6; $p = 1,000$ / *tnfa*: WT = 6812,2 ± 1677,8; KO = 8414,8 ± 4365,2; $p = 0,421$ / *inos*: WT = 271,3 ± 84,6; KO = 348,1 ± 164,1; $p = 0,690$)

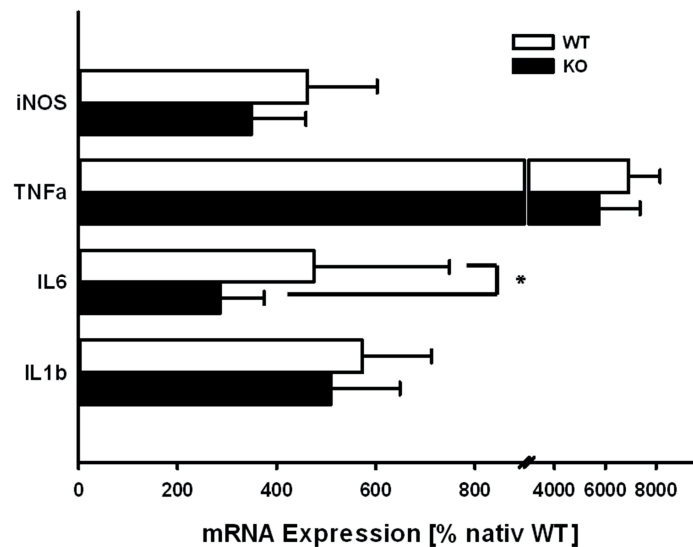


Abbildung 37: Inflammationsparameter p75NTR 5 d

(*il-1β*: WT = $573,6 \pm 139,1$; KO = $509,6 \pm 139,4$; $p = 0,140$ / *il-6*: WT = $475,4 \pm 273,8$; KO = $285,4 \pm 89,3$; $p = 0,031$ / *tnfa*: WT = $6910,2 \pm 1240,8$; KO = $5745,2 \pm 1620,6$; $p = 0,140$ / *inos*: WT = $462,5 \pm 140,4$; KO = $348,6 \pm 110,2$; $p = 0,070$)

5.3.4.2. Neurotrophine und ihre Rezeptoren

Anhand der WT-Tiere kann man einen signifikanten Anstieg um 54,5 % in der mRNA-Expression von p75NTR 24 h nach experimentellem SHT feststellen (WT nativ: $1,1 \times 10^{-4} \pm 1,2 \times 10^{-5}$ / WT 24 h post CCI: $1,7 \times 10^{-4} \pm 1,5 \times 10^{-5}$; $p = 0,016$). In Abb. 38 sind die absoluten Werte angegeben. 5 d nach OP kann man keine Veränderung in der Rezeptorexpression im Vergleich zum WT mehr nachweisen (Daten nicht gezeigt).

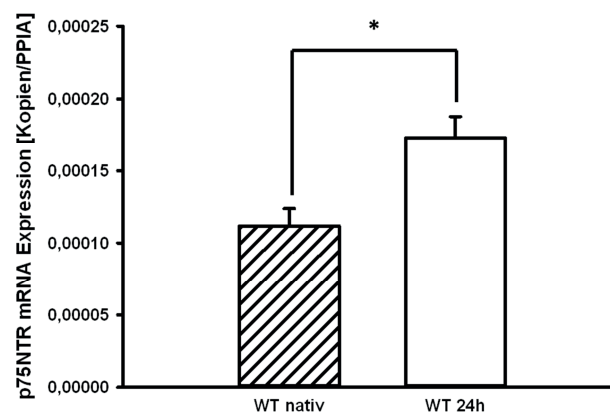


Abbildung 38: Expression des p75NTR in WT-Tieren

Für p75NTR kodierende mRNA kann bei den KO-Tieren im Gegensatz zu den WT-Tieren nicht nachgewiesen werden. 24 h nach CCI kommt es zu einer Hochregulation von *p75ntr* sowie der Neurotrophine *bdnf* und *ngf* im Vergleich zum nativen WT-Tier, wohingegen die Expression der Neurotrophinrezeptoren *sortilin*, *trk a* und *trk b* herabreguliert wird. Zwischen den Genotypen gibt es hierbei keine signifikanten Unterschiede (Abb. 39).

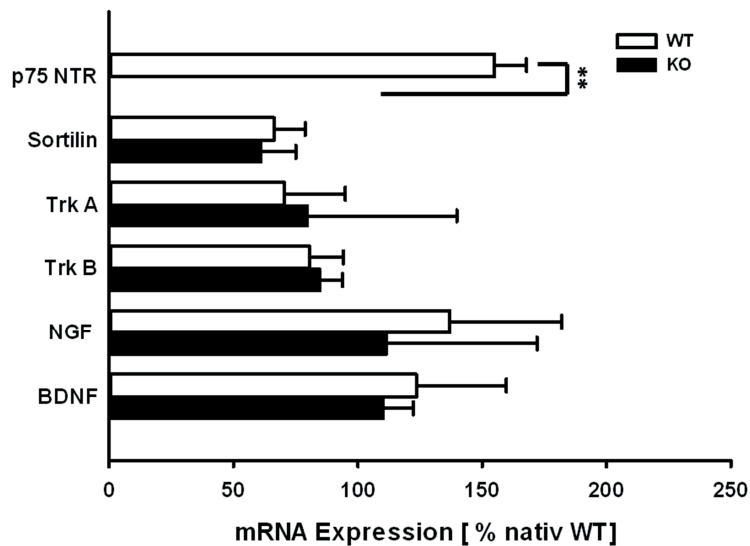


Abbildung 39: Neurotrophine und ihre Rezeptoren p75NTR 24 h

(*p75ntr*: WT = $154,8 \pm 13,0$; KO = $0,0 \pm 0,0$; $p = 0,008$ / *sortilin*: WT = $66,3 \pm 12,5$; KO = $61,2 \pm 13,9$; $p = 0,584$ / *trk a*: WT = $40,5 \pm 24,5$; KO = $80,0 \pm 59,9$, $p = 1,000$ / *trk b*: WT = $80,6 \pm 13,7$; KO = $84,9 \pm 8,9$; $p = 0,548$ / *ngf*: WT = $137,1 \pm 44,9$; KO = $111,7 \pm 60,4$; $p = 0,548$ / *bdnf*: WT = $123,5 \pm 36,2$; KO = $110,6 \pm 11,8$; $p = 0,841$)

Nach längerem Überleben (5 d) ist nur noch *ngf* (um 38,6 % im WT- und um 70,1 % im KO-Tier) stärker exprimiert als im Nativtier. Die Genaktivierung von Trk B, Sortilin und BDNF ist im KO-Tier im Vergleich zum WT-Tier signifikant verstärkt. Bei NGF liegt die gleiche Situation im Trend vor (Abb. 40).

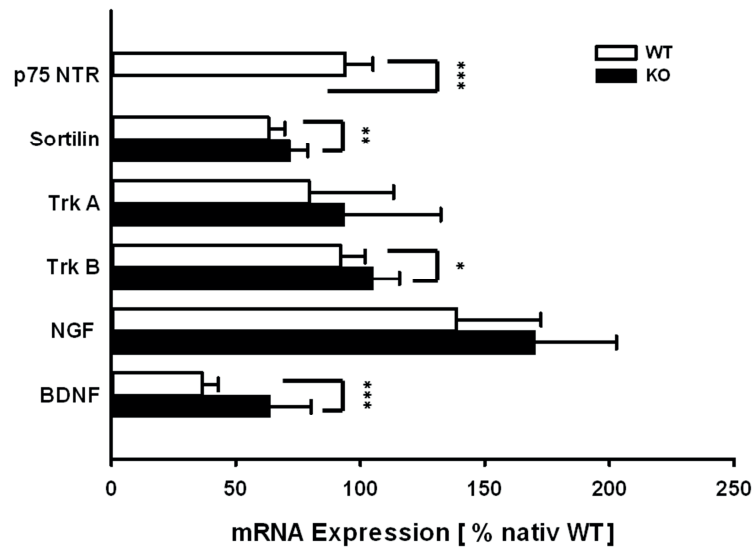


Abbildung 40: Neurotrophine und ihre Rezeptoren p75NTR 5 d

(*p75ntr*: WT = $93,7 \pm 11,3$; KO = $0,0 \pm 0,0$; $p < 0,001$ / *sortilin*: WT = $63,1 \pm 6,5$; KO = $71,6 \pm 7,2$; $p = 0,009$ / *trk a*: WT = $79,4 \pm 33,9$; KO = $93,6 \pm 38,7$; $p = 0,427$ / *trk b*: WT = $92,0 \pm 9,8$; KO = $105,1 \pm 10,7$; $p = 0,021$ / *ngf*: WT = $138,6 \pm 33,9$; KO = $170,1 \pm 32,7$; $p = 0,076$ / *bdnf*: WT = $36,5 \pm 6,4$; KO = $63,6 \pm 16,7$; $p < 0,001$)

5.3.5. Western Blot

Die Proteine wurden wie unter 4.14. beschrieben aus den kranialen ipsilateralen Quadranten extrahiert (nativ n = 2; WT und KO je n = 4) und jeweils 20 µg Protein aufgetragen. Die densitometrisch erhobenen Werte wurden gegen GAPDH normalisiert und als % WT nativ ausgedrückt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen sind auf die erste Nachkommastelle gekürzt.

5.3.5.1. α 2-Spectrin

In den p75NTR-Mäusen kommt es 24 h nach CCI zu einer vermehrten Spaltung von α 2-Spectrin, sodass es infolgedessen zu einem 185 %-igen (WT: $285,3 \pm 25,8$) bzw. 126 %-igen (KO: $226,8 \pm 26,3$) Anstieg seines 145 kDa / 150 kDa Spaltfragments kommt. Die Expression des Zelltodmarkers ist signifikant geringer in den KO-Mäusen als in ihren WT-Wurfgeschwistern ($p = 0,029$) (Abb. 41).

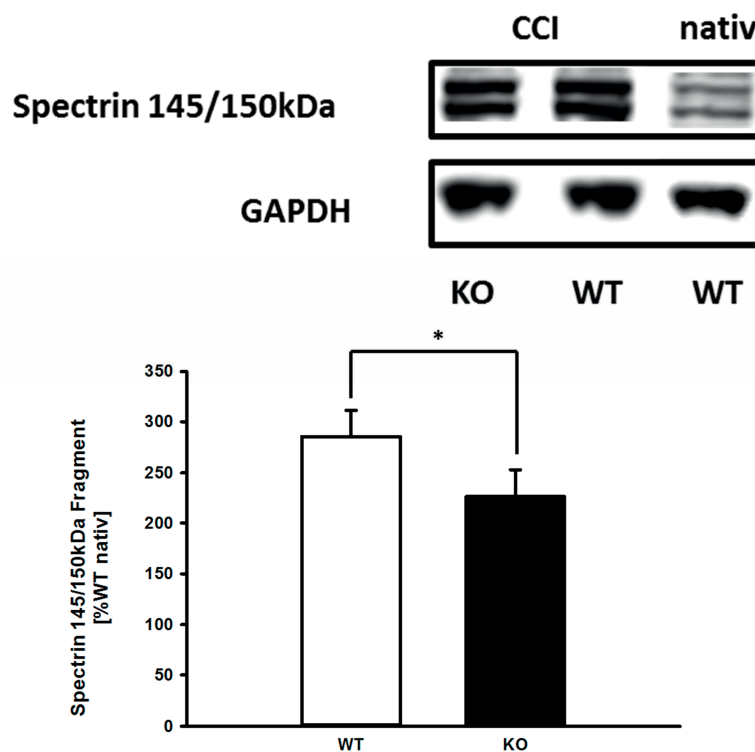


Abbildung 41: Spectrin Western Blot p75NTR 24 h

5.4. Einfluss einer pharmakologischen Inhibition des p75NTR nach SHT

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse des unter 4.15.3. beschriebenen Versuchs präsentiert. Bei der statistischen Auswertung liegt der Fokus auf dem Vergleich der Kontrollgruppe (TAT-Ctrl) und der HD-Gruppe.

5.4.1. Neuroscore und Gewichtsentwicklung

Die Ergebnisse des Neuroscores zeigen, dass die Tiere im Vergleich zu den mit TAT-Ctrl behandelten Tieren im Trend eine dosisabhängige Verbesserung der Neuro-Motorfunktion zeigen (TAT-Ctrl: $7,5 \pm 3,0$; LD: $6,4 \pm 2,6$; HD: $5,5 \pm 2,0$; p (TAT-Ctrl vs. TATPep5 HD) = 0,104) (Abb. 32).

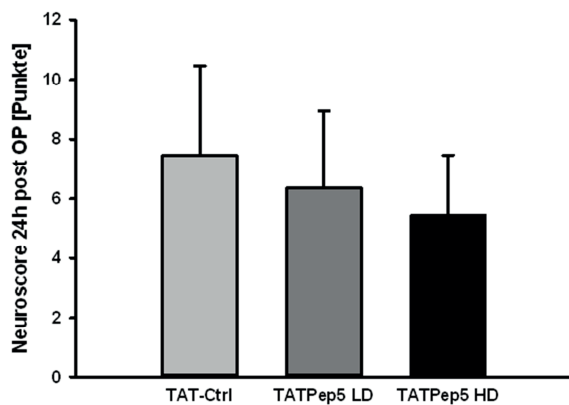


Abbildung 42: Neuroscore TATPep5 24h

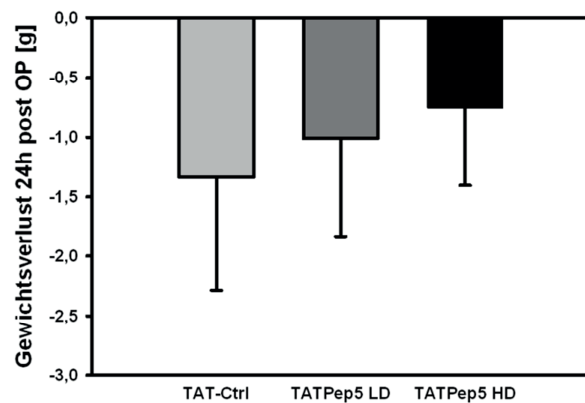


Abbildung 43: Gewichtsverlust TATPep5 24h

Für die Gewichtsentwicklung nach 24 h zeichnet sich ein ähnliches Bild ab, da die Tiere mit zunehmender Dosis im Mittel weniger Gewicht gegenüber den Kontrolltieren verlieren (TAT-Ctrl: $-1,3 \pm 0,9$; LD: $-1,0 \pm 0,8$; HD: $-0,8 \pm 0,7$; p (TAT-Ctrl vs. TATPep5 HD) = 0,092) (Abb. 43).

5.4.2. Kontusionsvolumen

Betrachtet man sich die Schadensgröße anhand Kreyslviolett-gefärbter Kryoschnitte erkennt man, dass die mit der hohen Dosis des p75NTR-Inhibitors TAT-Pep5 behandelten Tiere verglichen mit den Kontrolltieren ein um 18,8 % signifikant verkleinertes Schadensareal aufweisen (TAT-Ctrl: $47,0 \pm 7,4$; HD: $38,2 \pm 6,4$; $p = 0,018$). Die mit der 1 μM Dosis TAT-Pep5 behandelten LD-Tiere weisen einen ähnlich großen Schaden wie die Kontrolltiere auf (LD: $46,9 \pm 11,6$; $p = 0,896$) (Abb. 44).

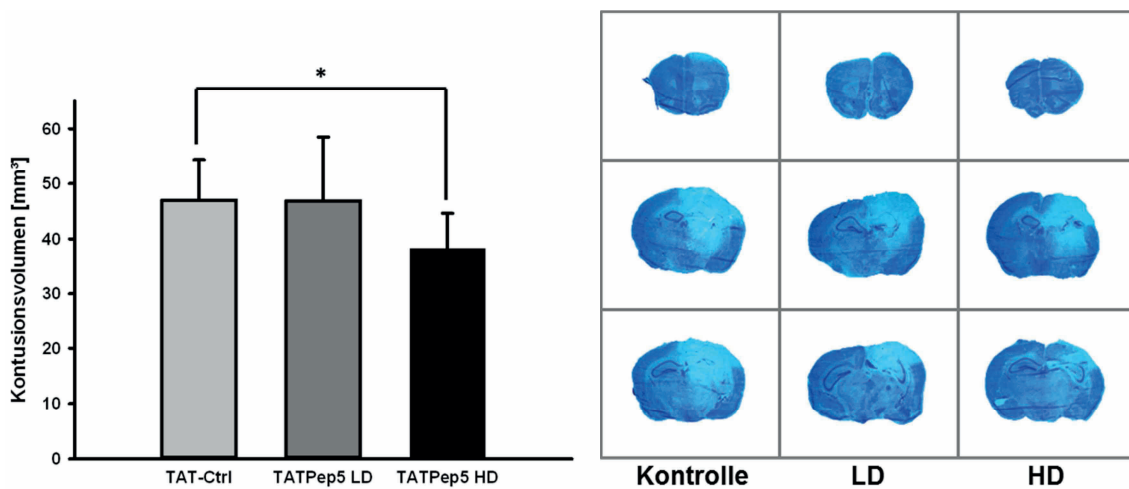


Abbildung 44: Kontusionsvolumen TAT-Pep5 24 h (Nissl-Färbung)

5.5. Einfluss einer pharmakologischen Inhibition des p75NTR auf die neurotoxische Wirkung von Propofol nach SHT

In den nachfolgenden Abschnitten 5.5.1. – 5.5.3. werden die Ergebnisse der unter 4.15.4.2. beschriebenen Versuche dargestellt. Da alle Tiere in dieser Studie TAT-Pep5 erhielten, liegt der Unterschied zwischen den Gruppen darin, ob sie Propofol oder dessen Vehikelsubstanz Lipofundin erhielten. Demgemäß werden die Gruppen im Verlauf dieser Arbeit als Propofol- oder Lipofundin-Gruppe bezeichnet.

Ein Tier der Propofol-Gruppe wurde am nächsten Morgen tot im Käfig aufgefunden. Der Kadaver war kalt und nicht mehr steif. Eine ausführliche pathologisch-anatomische Untersuchung wurde nicht durchgeführt.

5.5.1. Motorfunktionsanalyse und Gewichtsentwicklung

5.5.1.1. Neuroscore und Rota-Rod

Alle Tiere verschlechterten sich sowohl im Neuroscore- als auch beim Rota-Rod-Test infolge des experimentellen SHT. Des Weiteren kann unabhängig von den verabreichten Testsubstanzen keine signifikante Verbesserung der Tiere von Tag 1 zu Tag 3 festgestellt werden.

Analysiert man den Neuroscore, sieht man, dass die Tiere, die Propofol injiziert bekamen, im Trend an Tag 1 (Lipofundin: $3,6 \pm 2,3$; Propofol: $4,9 \pm 1,4$; $p = 0,095$) und an Tag 3 nach CCI (Lipofundin: $3,4 \pm 1,5$; Propofol: $4,7 \pm 1,8$; $p = 0,124$) eine schlechtere Punktzahl als die mit Lipofundin behandelten Tiere aufweisen (Abb. 45).

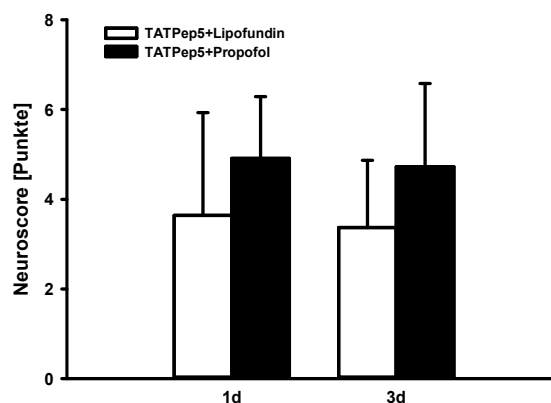


Abbildung 45: Neuroscore TAT-Pep5 + Propofol nach 24 h und 72 h

Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei der Betrachtung der Ergebnisse des Rota-Rods. Die Mäuse der Propofol-Gruppe halten sich sowohl an Tag 1 (Lipofundin: $-14,8 \pm 13,7$; Propofol: $-22,0 \pm 19,8$; $p = 0,175$) als auch an Tag 3 (Lipofundin: $-17,7 \pm 20,9$; Propofol: $-27,2 \pm 17,2$; $p = 0,229$) nach OP im Mittel weniger lang auf dem Rota-Rod als die Tiere der Lipofundin-Gruppe (Abb. 46). Allerdings kann man hier statistisch keine Signifikanz oder einen Trend erkennen.

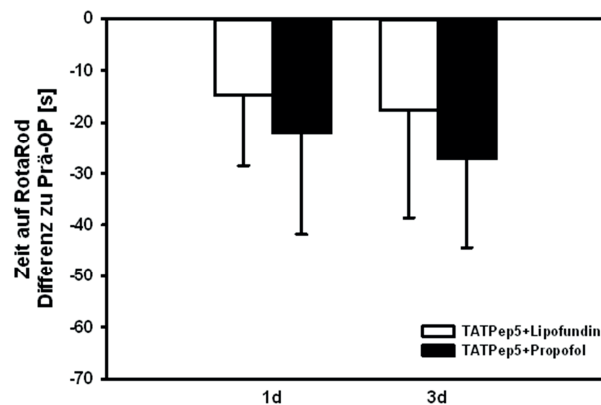


Abbildung 46: Rota-Rod TAT-Pep5 + Propofol nach 24 h und 72h

5.5.1.2. Gewichtsentwicklung

Allen Tieren gemein ist bei der Analyse der Gewichtsentwicklung, dass sie 24 h nach der OP Gewicht verloren und von Tag 1 zu Tag 3 wieder zugelegt haben. Vergleicht man die Tiere der Propofol-Gruppe statistisch mit den Tieren der Lipofundin-Gruppe lässt sich weder an Tag 1 (Lipofundin: $-1,9 \pm 0,7$; Propofol: $-1,6 \pm 0,5$; $p = 0,294$) noch an Tag 3 (Lipofundin: $-1,5 \pm 0,9$; Propofol: $-1,1 \pm 0,5$; $p = 0,228$) ein Trend oder eine Signifikanz ermitteln (Abb. 47).

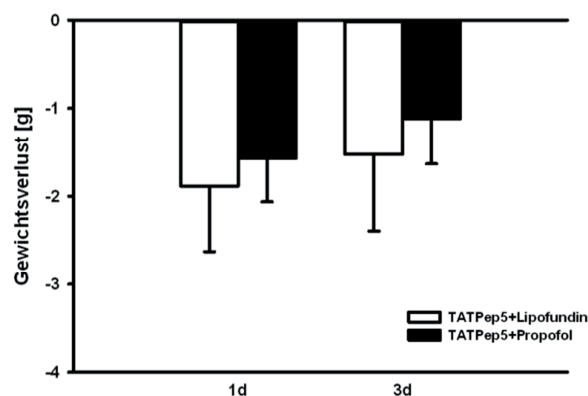


Abbildung 47: Gewichtsentwicklung TAT-Pep5 + Propofol nach 24 h und 72 h

5.5.2. Kontusionsvolumen

Das Kontusionsvolumen der untersuchten Tiere (s. 4.15.4.2.) unterscheidet sich zwischen den beiden Gruppen 72 h nach CCI nicht signifikant voneinander (Lipofundin: $35.3 \pm 6.0 \text{ mm}^3$; Propofol: $35.9 \pm 7.9 \text{ mm}^3$; $p = 0,479$) (Abb. 48).

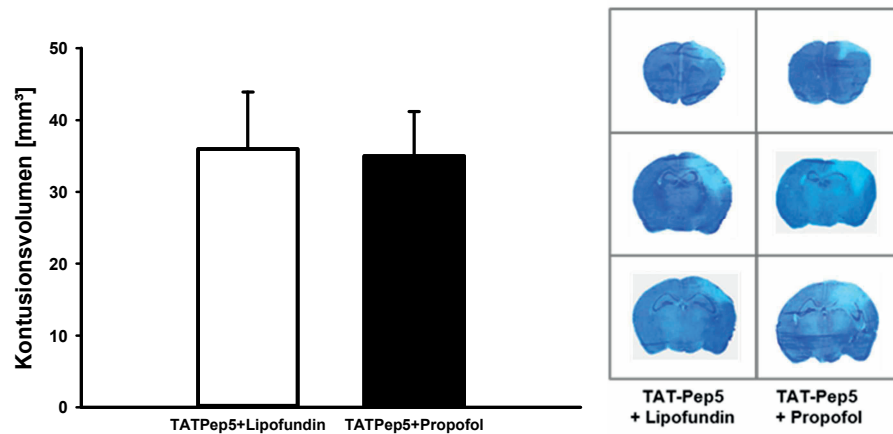


Abbildung 48: Kontusionsvolumen TAT-Pep5 + Propofol 72 h (Nissl-Färbung)

5.5.3. mRNA-Expression

Die mRNA wurde wie unter 4.11. beschrieben aus den caudalen ipsilateralen Quadranten extrahiert. Alle mittels qRT-PCR erhobenen Werte wurden gegen das Housekeeping-Gen PPIA normalisiert und sind als Absolutzahlen aufgeführt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen sind auf die zweite bzw. dritte Nachkommastelle gekürzt.

5.5.3.1. Inflammation

Die in der qRT-PCR untersuchten Zytokine *il-1 β* , *il-6* und *tnfa* sowie das Enzym *inos* zeigen in ihrer Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen (Abb. 49).

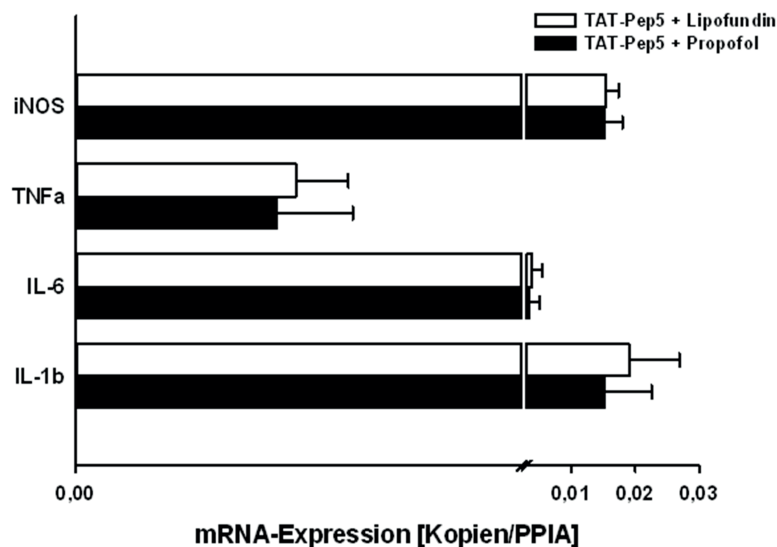


Abbildung 49: Inflammationsparameter TAT-Pep5 + Propofol 72 h

(*il-1 β* : Lipofundin = $0,02 \pm 0,008$; Propofol = $0,02 \pm 0,007$; $p = 0,222$ / *il-6*: Lipofundin $0,004 \pm 0,002$; Propofol = $0,003 \pm 0,002$; $p = 0,555$ / *tnfa*: Lipofundin = $0,0002 \pm 0,00006$; Propofol = $0,0002 \pm 0,00008$; $p = 0,340$ / *inos*: Lipofundin = $0,02 \pm 0,002$; Propofol = $0,02 \pm 0,003$; $p = 0,974$)

5.5.3.2. Neurotrophine und ihre Rezeptoren

Bei der Analyse der mRNA-Expression von *bdnf* als auch von *trk b* und *p75ntr* zeigt sich, dass die mit Propofol behandelten Tiere im Trend mehr *bdnf* im Gegensatz zur Vehikelgruppe exprimieren (Abb. 50).

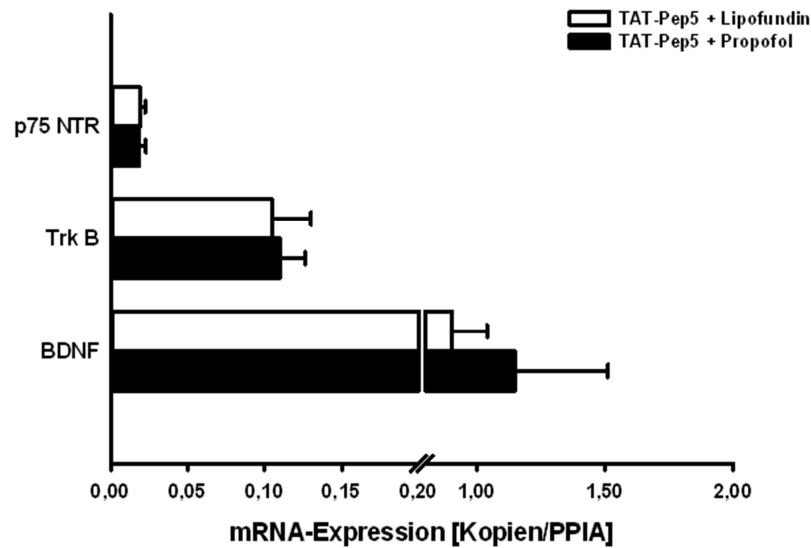


Abbildung 50: Neurotrophine und ihre Rezeptoren TAT-Pep5 + Propofol 72 h

(*bdnf*: Lipofundin = $0,90 \pm 0,14$; Propofol = $1,15 \pm 0,36$; $p = 0,053$ / *trk b*: Lipofundin = $0,10 \pm 0,03$; Propofol = $0,11 \pm 0,02$; $p = 0,277$ / *p75ntr*: Lipofundin = $0,02 \pm 0,004$; Propofol = $0,02 \pm 0,004$; $p = 0,926$)

5.5.4. Western Blot

Für die Auswertung der Proteinanalyse wurden die vorderen ipsilateralen Quadranten der aus Versuch 4.15.4.3. gewonnenen Proben lysiert und im Western Blot auf das 145 kDa / 150 kDa-große α 2-Spectrin-Spaltfragment untersucht. 6 h nach Propofol-Injektion und somit 30 h nach CCI kommt es zu einem signifikanten Anstieg des α 2-Spectrin-Fragments in der Propofol-Gruppe ($0,56 \pm 0,12$) verglichen mit den Vehikel-behandelten Tieren ($0,29 \pm 0,02$; $p = 0,023$). Gibt man den Tieren vor der Propofol-Injektion zusätzlich den p75NTR-Inhibitor TAT-Pep5 kommt es im Trend zu einer Reduktion des 145 kDa / 150 kDa Fragments im Vergleich zur Propofol-Gruppe ($0,38 \pm 0,08$; $p = 0,123$) (Abb. 51).

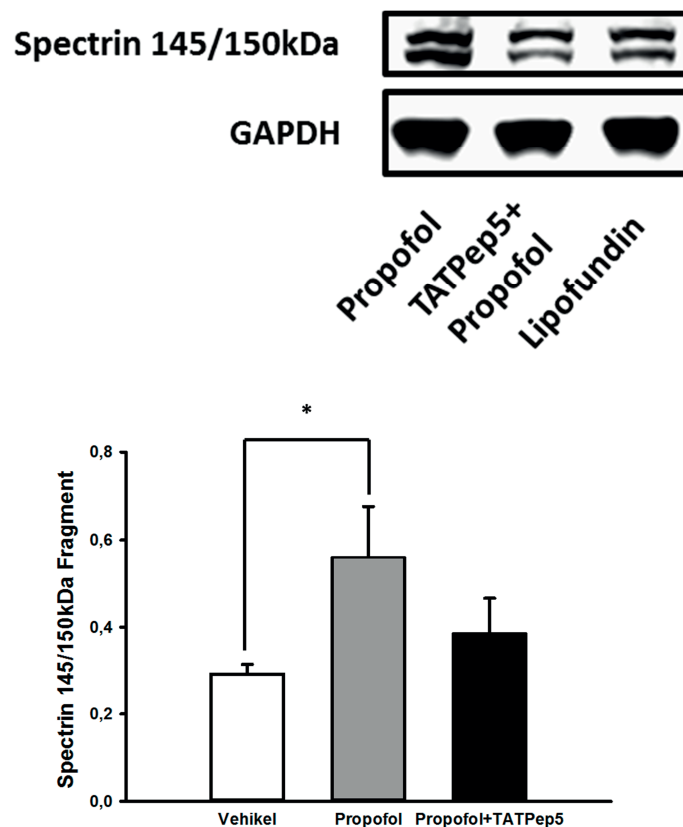


Abbildung 51: Spectrin-WB TAT-Pep5+Propofol 30 h

5.6. Einfluss einer genetischen Deletion des p75NTR-Co-Rezeptors Sortilin nach SHT

In diesem Abschnitt werden die Auswirkungen einer genetischen Deletion des Sortilin-Rezeptors, der als Co-Rezeptor für p75NTR fungiert, auf den Sekundärschaden nach SHT am Mausmodell untersucht. Die Ergebnisse gehen aus den unter 4.15.5. beschriebenen Versuchen hervor und sind analog zu den Versuchen bezüglich der Rolle von p75NTR aufgebaut.

5.6.1. Motorfunktionsanalyse

5.6.1.1. Neuroscore

Sowohl die Sortilin-WT- als auch die Sortilin-KO-Tiere weisen alle einen Ausgangswert von 0 Punkten auf, sodass im Diagramm nur die Werte von Tag 1 und Tag 5 aufgeführt sind. Weder an Tag 1 (WT: $5,8 \pm 3,2$; KO: $5,0 \pm 2,1$; $p = 0,969$) noch an Tag 5 (WT: $2,3 \pm 1,6$; KO: $2,3 \pm 1,6$; $p = 0,969$) ergeben sich signifikante Unterschiede für den NSS zwischen den Genotypen (Abb. 52).

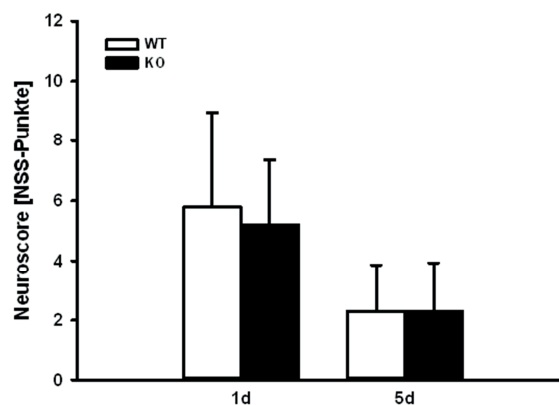


Abbildung 52: Neuroscore Sortilin mach 1 d und 5 d

5.6.1.2. Rota-Rod

Auch bei der Analyse der Rota-Rod Daten kann man keine Unterschiede in der Motorfunktion zwischen beiden Gruppen feststellen (Tag1: WT = -46.3 ± 33.7 ; KO = 46.4 ± 30.1 ; $p = 0.596$; Tag5: WT = -39.3 ± 32.9 , KO = -40.9 ± 24.8 , $p = 0.650$). Dargestellt ist jeweils die Differenz zwischen den an Tag 1 bzw. 5 erzielten Zeiten und dem Mittelwert der präoperativ erhobenen Daten (Abb. 53).

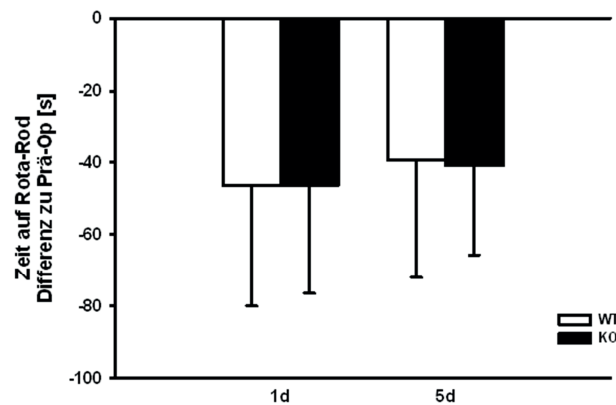


Abbildung 53: Rota-Rod Sortilin nach 1 d und 5 d

5.6.1.3. Gewichtsentwicklung

An Tag 1 nehmen die Tiere im Mittel ca. 10 % ihres Startgewichts ab. Fünf Tage nach OP nähern sie sich wieder ihrem Normalgewicht. Die Sortilin-WT-Tiere nehmen dabei ca. 58 %, die KO-Tiere ca. 43 % des verlorenen Gewichts wieder zu (Tag1: WT = -10.1 ± 2.2 ; KO = -9.5 ± 3.7 ; $p = 0.571$; Tag5: WT = -4.2 ± 3.7 ; KO = -5.7 ± 1.7 ; $p = 0.427$) (Abb. 54).

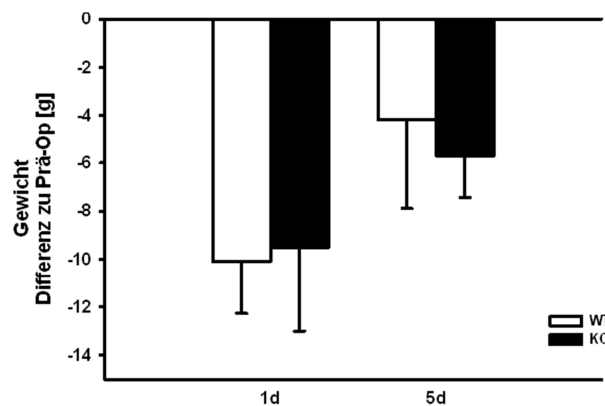


Abbildung 54: Gewicht Sortilin nach 1 d und 5 d

5.6.2. Kontusionsvolumen

Das anhand von Nissl gefärbten Schnitten berechnete Schadensareal ist in seiner Größe sowohl 24 h (WT: $26,3 \pm 4,6$; KO: $23,3 \pm 4,2$; $p = 0,345$) (Abb. 55) als auch 5 d (WT: $12,7 \pm 2,1$; KO: $14,2 \pm 4,1$; $p = 0,623$) (Abb. 56) nach SHT zwischen beiden Genotypen nicht signifikant unterschiedlich.

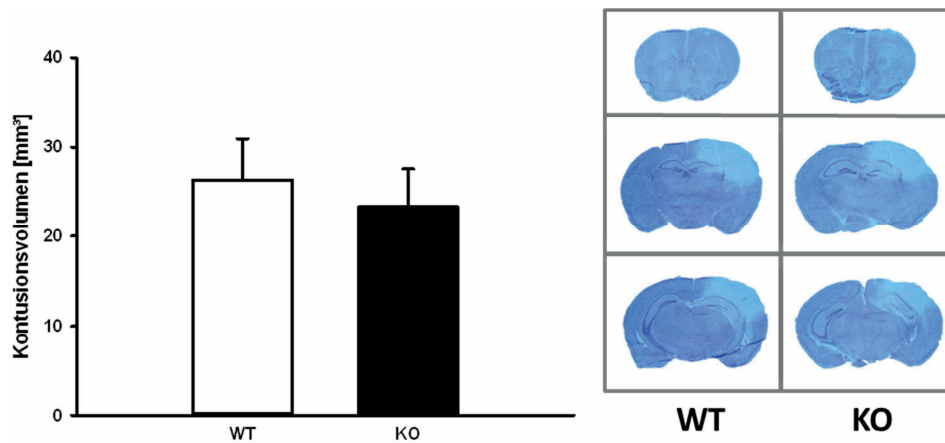


Abbildung 55: Kontusionsvolumen Sortilin 24 h (Nissl-Färbung)

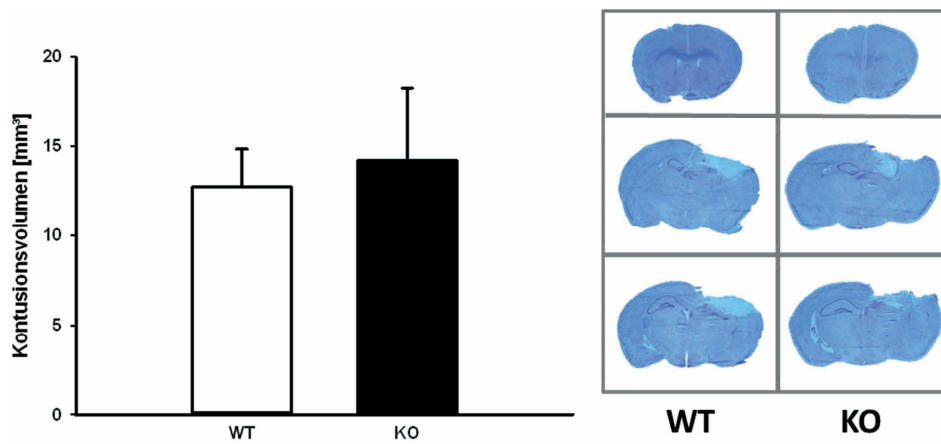


Abbildung 56: Kontusionsvolumen Sortilin 5 d (Nissl-Färbung)

5.6.3. mRNA-Expression

Aus den Cortex-Proben, die in dem unter 4.15.5.2. beschriebenen Versuch gewonnen wurden, wurde die mRNA extrahiert und mittels qRT-PCR die Expression der Inflammationsparameter sowie die der Neurotrophine und ihrer Rezeptoren bestimmt.

5.6.3.1. Inflammation

Sowohl bei den WT- als auch bei den KO-Tieren lässt sich ein Anstieg der untersuchten Inflammationsparameter im Vergleich mit nativen Sortilin-WT-Tieren konstatieren. *il-6* ist in den KO-Tieren im Trend stärker exprimiert als in deren WT-Wurfgeschwistern (WT: $2047,6 \pm 1392,6$; KO: $3613,1 \pm 675,5$; $p = 0,063$) wohingegen bei *il-1 β* (WT: $5117,6 \pm 2301,4$; KO: $4252,6 \pm 2095,3$; $p = 0,413$), *tnfa* (WT: $2183,2 \pm 728,0$; KO: $2669,3 \pm 375,7$; $p = 0,310$) und *inos* (WT: $277,2 \pm 101,2$; KO: $317,7 \pm 159,2$; $p = 0,730$) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen zu verzeichnen sind (Abb. 57).

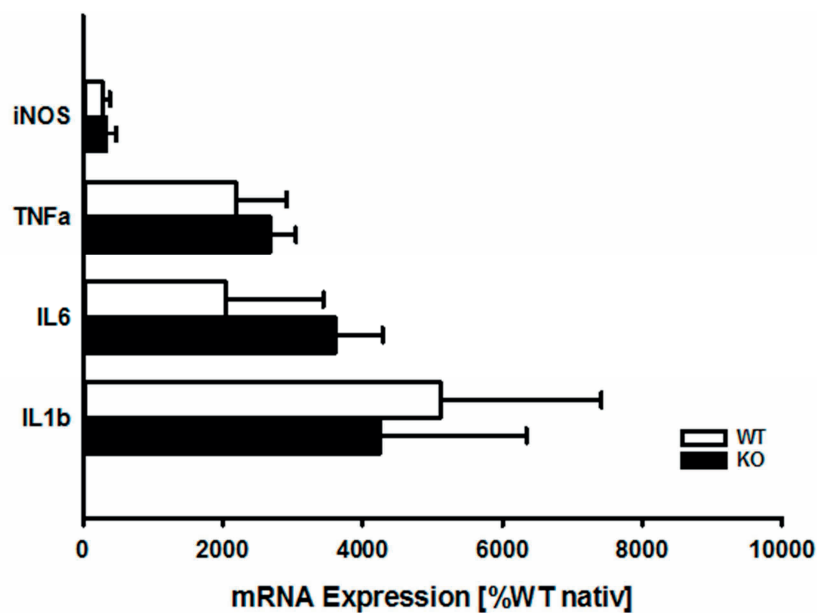


Abbildung 57: Inflammationsparameter Sortilin 24 h

5.6.3.2. Neurotrophine und ihre Rezeptoren

24h nach SHT kann man sowohl in Sortilin-KO als auch in den korrespondierenden Wurfgeschwistern eine Expressionssteigerung von p75NTR um ca. 100 % im Vergleich zum nativen Sortilin-WT-Tier sehen, jedoch ist dieser Anstieg in beiden Genotypen gleich stark ausgeprägt (WT: $202,7 \pm 109,9$; KO: $196,5 \pm 79,7$; $p = 1,000$). Betrachtet man sich die Rohwerte der p75NTR-Expression nach SHT kann man auch hier zwischen Sortilin-WT- ($0,0987 \pm 0,0519$ Kopien / *ppia*) und Sortilin-KO-Tieren ($0,0928 \pm 0,0377$ Kopien / *ppia*) keinen signifikanten Unterschied ($p = 1,000$) feststellen (Daten nicht gezeigt). Bei der Analyse des mRNA-Expressionsmusters der Neurotrophine NGF (WT: $220,3 \pm 57,1$; KO: $266,0 \pm 68,8$; $p = 0,151$) und BDNF (WT: $78,211 \pm 10,3$; KO: $97,3 \pm 22,5$; $p = 0,310$) sowie des Trk B Rezeptors (WT: $73,0 \pm 12,2$; KO: $79,2 \pm 22,8$; $p = 1,000$) kann zwischen den Sortilin-KO-Tieren und ihren WT-Wurfgeschwistern kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 58). In den vorliegenden Cortex-Proben lag das Expressionslevel von *trk a* unter der Detektionsgrenze, sodass hierfür keine Daten vorliegen.

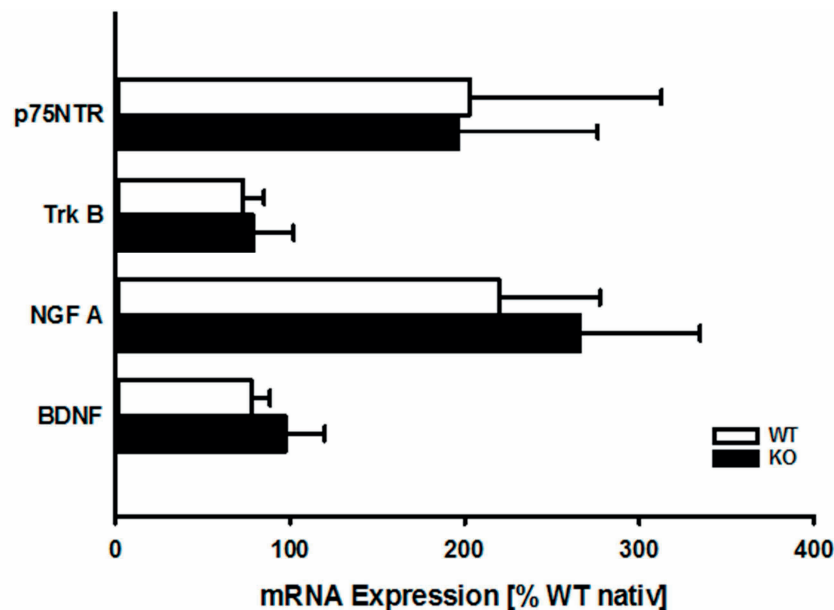


Abbildung 58: Neurotrophine und ihre Rezeptoren Sortilin 24 h

6. Diskussion

6.1. Verifizierung *knock-out* Maus

6.1.1. p75NTR

Die durchgeführte Western Blot Analyse mit einem gegen p75NTR gerichteten Antikörper bringt hier erwartungsgemäß kein eindeutiges Ergebnis, da die KO-Tiere nur eine funktionell veränderte Isoform des p75NTR aufweisen, der lediglich die Bindungsstelle für die Neurotrophine fehlt (227). Der verwendete Antikörper bindet jedoch in einem anderen Bereich des Rezeptors und detektiert somit beide Isoformen.

Die mRNA-Analyse zeigt bereits im HE-Tier eine fast 50 %-ige Reduktion der Rezeptorexpression. Die eingesetzten Primer sind so konzipiert, dass sie im Bereich des Exon 3 binden. Da aus den Proben der KO-Tiere kein Produkt gebildet wird, kann davon ausgegangen werden, dass diesen Tieren die funktionelle Neurotrophin-bindende Einheit des Rezeptors fehlt.

6.1.2. Sortilin

In den Sortilin-KO-Tieren kommt es anders als bei den p75NTR-KO-Tieren zu einer kompletten Deletion des Rezeptors (18). Der Nachweis, dass in den verwendeten Tieren kein Sortilin-Protein exprimiert wird, erfolgt mittels Western Blot. Allen untersuchten nativen KO-Tieren fehlt die mit einer Größe von 95 kDa für Sortilin spezifische Bande. Allerdings weisen die Tiere im Vergleich zu ihren nativen WT-Wurfgeschwistern eine schmale schwache Bande bei ca. 85 kDa auf. Eventuell könnte es sich hier um ein trunkiertes Protein handeln. Ob dies funktionsfähig ist, ist fragwürdig und wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

6.2. Zeitreihe zur Protein-Expression von p75NTR, Sortilin und α 2-Spectrin

Im Verlauf der Ausbildung des Sekundärschadens kommt es zu vielfältigen Veränderungen der Proteinhomöostase der Zellen. Um das Expressionsmuster von Neurotrophen und ihren Rezeptoren zu untersuchen, ist es sinnvoll sowohl die mRNA mittels qRT-PCR als auch den Proteinnachweis im Western Blot zu untersuchen, da somit auch eventuelle post-translationale Veränderungen berücksichtigt werden können.

p75NTR spielt eine wichtige Rolle während der Synaptogenese, im adulten Gehirn ist der Rezeptor dagegen gering exprimiert (251). Erst unter pathologischen Konditionen wie Ischämie, Rückenmarks- oder Faszialisnerv-Verletzungen (153, 252, 253) konnte eine erneute verstärkte Expression festgestellt werden. Für das SHT-Modell zeigen Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe einen starken Anstieg der für p75NTR kodierenden mRNA. Der Protein-Nachweis mittels Western Blot bestärkt die Hypothese, dass sowohl in der Frühphase als auch im weiteren Verlauf nach SHT ähnlich wie nach anderen zerebralen Insulten der Neurotrophenrezeptor im Gehirn erneut hochreguliert ist und ihm somit eine Bedeutung bei der Entstehung sekundärer Schäden zukommt (12, 94).

Die gesteigerte Protein-Expression von Sortilin bekräftigt dessen Funktion als Co-Rezeptor von p75NTR bei der Auslösung des apoptotischen Signalwegs besonders in der Akutphase nach SHT (254). Die Diskrepanz zwischen der Analyse der mRNA-Expression und dem Nachweis des Sortilin-Proteins könnte in den unterschiedlichen Halbwertszeiten liegen, da die der mRNA stark variiert und die des Proteins mit 48-72h verhältnismäßig lang ist (255, 256).

Viele Arten der Zellschädigung gehen mit einem vermehrten Kalzium-Einstrom einher. Infolgedessen spalten Calpaine den Zytoskelettbestandteil α 2-Spectrin. Dies führt zu einer Ansammlung seines 145 kDa / 150 kDa-Spaltfragments (257). Der enorme Anstieg dieses Zelltodmarkers belegt, dass der programmierte Abbau stützender Zellfilamente, gekennzeichnet durch die Calpain-Aktivität, als wichtiger Effektor in der posttraumatischen apoptotischen Entwicklung herangezogen werden kann (258).

6.3. Einfluss einer genetischen Defizienz des p75NTR nach SHT

Um herauszufinden, ob die gesteigerte Expression des p75NTR von Belang für die Sekundärschadensentwicklung nach SHT ist und ob dies durch die Bindung von Neurotrophinen vermittelt ist, wurde in der vorliegenden Arbeit Mäusen ein CCI appliziert, die durch einen Verlust der Neurotrophin-Bindungsstelle gekennzeichnet sind (s. 4.2.2.). Eine weitere beschriebene Maus-Mutante weist eine Veränderung im Exon 4 des für p75NTR kodierenden Genabschnitts auf und soll im Gegensatz zur Exon 3-Mutante keine verkürzte Splicing-Variante des Rezeptors ausbilden (s-p75NTR), deren Bedeutung nicht abschließend geklärt ist (259). Allerdings konnte auch in den Exon 4-Mäusen die Bildung eines trunkierten Proteins nachgewiesen werden, das zudem p75NTR-vermittelte apoptotische Signalkaskaden auszulösen vermag (Aktivierung von JNK-3 und Spaltung von Pro-Caspase-3) (260). In der vorliegenden Arbeit steht die Wechselwirkung der Neurotrophine mit dem p75NTR im Fokus des Interesses, sodass die gewählte Maus-Mutante die nötigen Eigenschaften besitzt und gleichzeitig der negative systemische Einfluss im Vergleich mit der Exon 4-Mutante gemindert ist (228). Die Deletion des Exon 3 von p75NTR der eingesetzten Tiere wurde in der qRT-PCR erneut verifiziert.

Die duale Funktion von p75NTR spiegelt sich bereits speziesspezifisch während der Entwicklung des Nervengeflechts wider. Während p75NTR im Frosch das Überleben von retinalen Neuronen fördert (261), führt es im Huhn zu deren Absterben (262).

Die synaptische Plastizität wird insbesondere durch das Gegenspiel der als Liganden fungierenden Neurotrophine und deren unprozessierten Pro-Formen mit ihren korrespondierenden Rezeptoren p75NTR sowie Trk A und B bedingt (263). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass es nach CCI zu einer Dysregulation der Neurotrophine und ihrer Rezeptoren kommt, wobei p75NTR und NGF stark erhöht sind (94). Der in dieser Zeitreihenanalyse beschriebene signifikante Anstieg der Expression von p75NTR 24 h nach CCI im WT wird mit den vorliegenden Daten bestätigt und stimmt mit weiteren Studien überein, die einen Anstieg des Rezeptors sowie von proNGF nach neuronaler Schädigung proklamieren (264-266).

Die genetische Modulation der Neurotrophin-Bindungsstelle des p75NTR führt zu einer Reduktion des Kontusionsvolumens in der Akutphase 24 h und auch nach einer verlängerten Überlebenszeit von 5 d nach CCI. Dies lässt darauf schließen, dass die Signalkaskaden, die durch diese Verbindung ausgelöst werden wesentlich zur Ausbildung des sekundären Schadens beitragen. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse der folgenden Studien

gestützt: Griesmaier et al. konstatiert ein verkleinertes Läsionsvolumen in einem Exzitotoxizitätsmodell an perinatalen p75NTR-KO-Tieren, wobei dies nur auf die männlichen nicht aber auf die weiblichen Tiere zutraf (267). Dieser geschlechtsspezifische Unterschied war in der hier vorliegenden Arbeit nicht nachzuvollziehen. Die Bedeutung von p75NTR nach Ischämie wird aufgrund einer durch oxidativen Stress bedingten verstärkten Expression des Rezeptors als auch durch verringertes Infarktvolumen in p75NTR-KO-Tieren beschrieben (131). Zuletzt ist auch die Regeneration von Motoneuronen nach Schädigung in p75NTR-KO-Tieren beschleunigt (268).

Die Elimination der Neurotrophin-Bindungsstelle manifestiert sich auch in einem positiven Einfluss auf die motorische Funktion nach SHT. In der Frühphase nach CCI ist die Beeinträchtigung der Lokomotion und Koordination durch das SHT am größten, was sich in den erhöhten Neuroscore-Werten in den Ergebnissen dieser und anderer Arbeiten widerspiegelt (269-271). Zu diesem Zeitpunkt erzielen die KO-Tiere außerdem signifikant bessere Werte auf dem Rota-Rod. Dies stimmt mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen überein, die eine verbesserte Motorfunktion nach Hemmung des p75NTR durch Antisense-Peptid-Nukleinsäuren oder LM11A-31 (s. 6.4.) im Amyotrophen Lateralsklerose- und Rückenmarkverletzungs-Modell zeigen konnten (272, 273).

Die Entstehung des sekundären Schadens ist sowohl durch nekrotischen als auch durch apoptotischen Zellverlust gekennzeichnet. Zur Bestätigung der histologischen Befunde und als mechanistischen Erklärungsansatz kann man daher die Aktivität von Calpainen untersuchen, die nach SHT und Ischämie gesteigert ist (274, 275). Durch erhöhten Kalzium-Ionen-Influx spalten Calpaine enzymatisch Zytoskelettbestandteile wie Aktin oder α 2-Spectrin (250, 257, 276). Der verminderte Nachweis des 145 kDa / 150 kDa-großen α 2-Spectrin-Fragments 24 h nach CCI im KO-Tier weist darauf hin, dass die Bindung von Neurotrophinen an p75NTR zu einer Destabilisierung der Zelle führt. Die Chopper-Domäne von p75NTR scheint dabei maßgeblich an der Aktivierung von Calpainen beteiligt zu sein (139). Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von Calpainen direkt oder von p75NTR auch bei anderen Neuropathien wie Alzheimer und Ischämie das Absterben von Neuronen verhindert (277, 278). Da der Nachweis von α 2-Spectrin-Spaltfragmenten im Liquor mit der Schwere des SHT in menschlichen Probanden korreliert, werden sie als potentielle Biomarker beschrieben und werden auch als solche bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer diskutiert (279, 280).

Der Zelluntergang, der mit dem sekundären Schadenswachstum einhergeht, ist von einer starken Immunantwort begleitet (281). Diese setzt unmittelbar nach der primären Gewebeschädigung ein und ist nach Rückenmarksverletzungen bis zu einem halben Jahr nachweisbar (282, 283). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass *il-1 β* , *il-6*, *tnfa* und *inos* in der Akutphase ihren Peak haben und auch nach 5 d noch weit über dem nativen Niveau liegen. Inwieweit dies zu einer zusätzlichen Gewebeschädigung beiträgt oder als Reparaturmechanismus dient, muss differenziert betrachtet werden (284). Die hier untersuchten Zytokine können als repräsentative posttraumatische Inflammations-Indikatoren angesehen werden (285), da sie auch in humanem Gewebe von SHT-Patienten stark erhöht vorliegen und darüber hinaus die mRNA-Level mit der Expression des jeweiligen Proteins korrelieren (286). Erhöhte IL-1 β -Werte werden überdies in Zusammenhang mit dem Absterben hippocampaler Neurone gebracht (287). Besonders im Verlauf der Zeit von 5 d nach CCI weisen die p75NTR-KO-Tiere eine verminderte Immunantwort im Vergleich zu ihren WT-Wurfgeschwistern auf. Obwohl die Hemmung von p75NTR auch in anderen Studien zu einer Beeinträchtigung der Inflammation geführt hat (288, 289), ist in diesem Fall weniger von einer direkten Beeinflussung auszugehen sondern eher davon, dass die verminderte Schadensgröße weniger Entzündungsreaktion hervorruft. Insbesondere da Quellen einen Zusammenhang zwischen Läsions- bzw. Infarkt volumen und erhöhten Zytokin-Werten angeben (290, 291).

Die übermäßige Expressionssteigerung von p75NTR und dessen Aktivierung durch Pro-Neurotrophine werden begleitet von einer Dysregulation der Neurotrophine sowie der neurotrophen Trk-Rezeptoren im perikontusionalen Gewebe. Ein Ungleichgewicht zwischen Neurotrophen und ihren Pro-Formen führt vermehrt zu Neurodegeneration (292, 293). In Abwesenheit von funktionierendem p75NTR sind die Expressionslevel von *bdnf* und dessen korrespondierenden Rezeptor *trk b* erhöht. Dies deutet auf eine schneller einsetzende Regeneration aufgrund von Aktivierung neurotropher Mechanismen hin (294). Entweder ist dieser Effekt ähnlich der verringerten Zytokin-Produktion auf dem kleineren Schadensvolumen begründet oder auf der Tatsache, dass die Neurotrophinrezeptoren sich gegenseitig beeinflussen. So kommt es z.B. nach Status epilepticus zu einem Switch von Trk B zu p75NTR (295). Ist p75NTR wie im vorliegenden Fall nicht funktionsfähig, würde dieser Umschwung nicht zu vermehrter Apoptose führen und Trk B wäre in seiner Funktion weniger eingeschränkt. Eine Überexpression von Trk A ist überdies in der Lage, den entwicklungsbedingten p75NTR-vermittelten Tod von Neuronen zu unterbinden (296). Masoudi et al. unterstützen die aufgeführte Hypothese, dass die neuroprotektive Wirkung der

Neurotrophine stark vom Expressionsverhältnis von p75NTR und den Trk-Rezeptoren abhängt (297).

Abb. 59 verdeutlicht zusammenfassend die zentrale Relevanz von p75NTR nach SHT. Die gesteigerte Ausschüttung von Pro-Neurotrophinen in Kombination mit deren unzureichender Spaltung in ihre mature Form führt dazu, dass sie als Liganden von vermehrt an der Zelloberfläche exprimiertem p75NTR fungieren und verstärkt Apoptose auslösen. Durch die zeitgleiche Herunterregulation der Trk-Rezeptoren werden Signalwege, die Zellwachstum und -differenzierung fördern in geringerem Maße aktiviert. Dies führt letztendlich zur Vergrößerung des sekundären Schadens aufgrund des Ungleichgewichts von pro-apoptotischen und neurotrophen Faktoren.

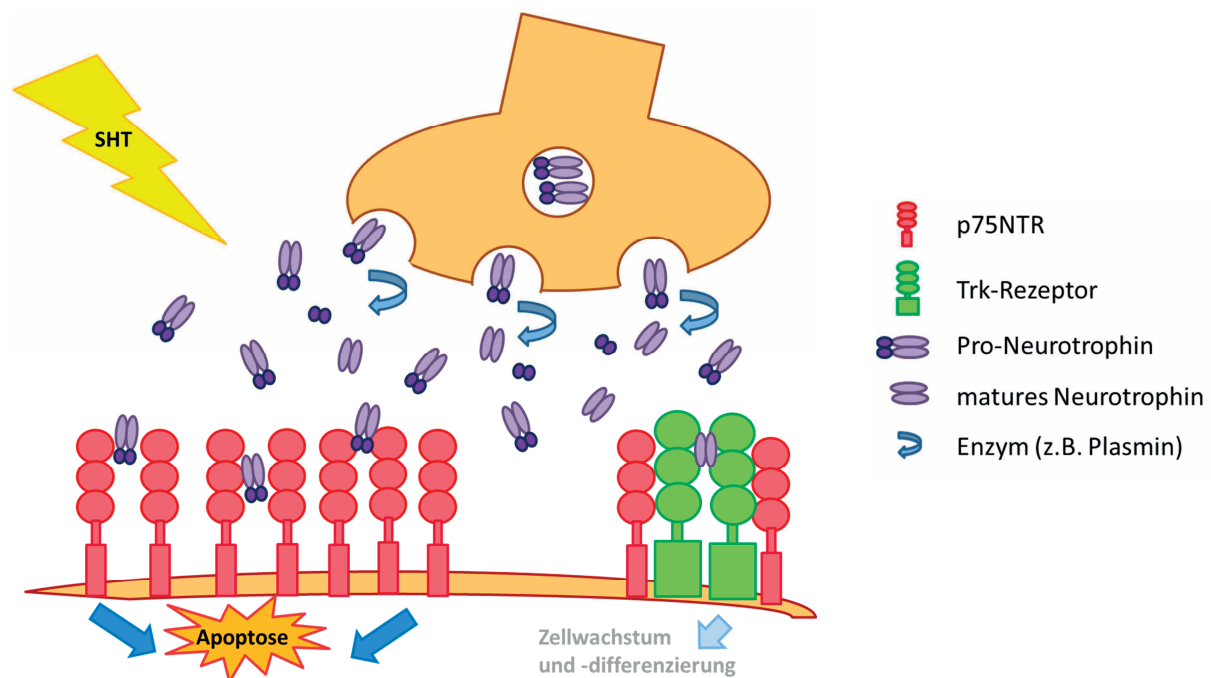


Abbildung 59: Einfluss des SHT auf die Funktionsweise von p75NTR

p75NTR steht auch im Zusammenhang mit veterinärmedizinisch relevanten Krankheitsbildern. *In vitro* Studien zeigen eine überschießende Expression des Rezeptors bei spongioformen Encephalopathien und liefern Ansatzpunkte, dass die neurotoxische und apoptotische Wirkung des Prionen Peptids (PrP) 106-126 über einen p75NTR-vermittelten Signalweg ausgelöst wird (298, 299). Zudem wurde p75NTR als Rezeptor für das Glykoprotein des Tollwut-Virus identifiziert. Zwar trägt der Neurotrophinrezeptor zur Infektion von neuronalen Zellen und der Internalisierung des Virus bei (300), scheint hierbei aber nicht der einzige ausschlaggebende Faktor zu sein (301).

Letztendlich ist die Übertragbarkeit der aus Tierversuchen gewonnen Ergebnisse auf den Menschen mitunter schwer (302-304). Der Tierversuch ist allerdings unumgänglich und das in dieser Arbeit verwendete SHT-Modell ist aufgrund seiner unter 2.2.4. beschriebenen Vorteile gut dafür geeignet zu helfen, grundlegende Mechanismen aufzuklären.

6.4. Einfluss einer pharmakologischen Inhibition des p75NTR nach SHT

Um den Mechanismus näher zu beleuchten, der infolge der p75NTR-Aktivierung zur Entstehung des Sekundärschadens führt und diesen in eine in der Praxis anwendbare Therapieoption zu überführen, wurde die Auswirkung einer TAT-Pep5 Gabe nach experimentellem SHT untersucht.

TAT-Pep5 ist ein pharmakologischer Inhibitor von p75NTR und gehört zur Klasse der TAT-Fusionsproteine. Der TAT-Anteil ist dem Humanen Immundefizienz Virus (HIV) nachempfunden und fördert die Internalisierung des Peptids in die Zelle sowie den Übertritt von Proteinen durch die Blut-Hirn-Schranke (305, 306). Dort bindet es an den intrazellulären Teil des p75NTR und verhindert die Ankopplung von Ras homolog gene family member-Guanindiphosphat (RhoA-GDP). Infolgedessen würde ansonsten GDP durch Guanidintriphosphat (GTP) ersetzt und die aktivierte Form RhoA-GTP führt via Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1 (ROCK) zur Destabilisierung des Zytoskeletts (223). Verschiedene Autoren konnten einen positiven Effekt einer 10 μ M TAT-Pep5 Applikation auf die durch Isofluran bedingte Neurotoxizität in juvenilen Zellen und Tieren zeigen, was mit verminderter RhoA- und Caspase-Aktivierung einhergeht (23, 223).

Um zu überprüfen, ob der Inhibitor in adulten Tieren eine ähnliche Wirkung hat, wurde in der vorliegenden Arbeit neben der etablierten 10 μ M Dosierung eine weitere, niedrigere 1 μ M Dosis untersucht, da Jungtiere aufgrund des erhöhten Stoffwechsels oft eine höhere Wirkstoffkonzentration benötigen. Beide TAT-Pep5-Konzentrationen liegen weit unter der kritischen Marke von 100 μ M, die bei TAT-Fusionsproteinen als zytotoxisch beschrieben worden ist (307). Die Applikationszeitpunkte wurden so gewählt, dass der i.v. Bolus in der Phase der ersten Hochregulation des p75NTR (94) wirken kann und die s.c. Injektion nach weiteren 6 h den Wirkspiegel aufrecht erhält, um dann 24 h postoperativ die Auswirkungen auf die akute Läsionsexpansion untersuchen zu können.

In der adulten Maus führt nur die hohe Dosis (10 μ M) zu einer signifikanten Verminderung des sekundären Schadenswachstums, wohingegen die niedrige Dosierung (1 μ M) nicht

auszureichen scheint, um p75NTR effektiv zu blockieren und den gesteigerten Zelltod zu unterbinden. Die neurotoxischen Auswirkungen einer p75NTR-Aktivierung konnten auch von Cheema et al. gezeigt werden, in deren Studie eine Reduktion des Untergangs von sensorischen Neuronen infolge von Axotomie über eine Verringerung des p75NTR-Expressionslevels mit Hilfe von Antisense-Oligonukleotiden erreicht wurde (308).

Die pharmakologische Blockierung von p75NTR scheint sich des Weiteren positiv auf den Erholungsverlauf nach CCI auszuwirken, da die HD-Tiere weniger Gewicht verlieren und auch neuromotorisch fitter sind als die Tiere, die mit dem Kontrollpeptid behandelt wurden.

Die Aktivierung von RhoA, initiiert durch die Verbindung von Pro-Neurotrophinen und p75NTR, führt zur Destabilisierung der Zelle durch Beeinträchtigung des Zytoskeletts und letztendlich zum Zelltod. Unterbindet man diesen Signalweg durch den Einsatz von KO-Mäusen oder blockierenden Substanzen, überleben die Zellen *in vitro* und *in vivo* (309, 310). Obwohl die RhoA Aktivierung hier nicht explizit überprüft wurde, kann davon ausgegangen werden, dass in ausgewachsenen Tieren der Signalweg genauso wie in Jungtieren unterbunden wird und somit ein kleineres Läsionsareal die Folge ist (23).

Nachdem Studien bereits die anti-apoptotische Wirksamkeit von TAT-Fusionsproteinen *in vitro* und *in vivo* anhand von Sehnerv-Läsions- und Ischämie-Modellen (311-314) belegen konnten, stellt sich TAT-Pep5 nun auch als vielversprechender therapeutischer Ansatzpunkt für SHT-Patienten dar, besonders da es i.v. applizierbar ist.

Ein Nachteil bei der klinischen Anwendbarkeit von TAT-Fusionsproteinen könnte darin bestehen, dass größere Eiweißstrukturen ein erhöhtes allergenes Potential aufweisen und die Cargo-Systeme der Zellen bei bestimmten Strukturen an ihre Grenzen stoßen (315). In letzter Zeit wurden daher kleine nicht-peptidale Moleküle entwickelt, die in ihrer Funktion TAT-Pep5 ähneln. Zu dieser Gruppe gehören LM11A-31 und -24, die die Verbindung von proNGF mit p75NTR unterbinden (316). Nach experimentellem SHT (CCI) an jugendlichen Ratten reduziert LM11A-31 den neuronalen Zelltod und fördert kognitive Funktion und Neurogenese (317). Außer bei Pilocarpin-induzierten Krampfanfällen (318) konnte die neuroprotektive Wirkung dieser Moleküle in weiteren neuronalen Krankheitsmodellen bestätigt werden. Dazu zählen insbesondere Tiermodelle für die Alzheimer Krankheit (288, 319, 320), Amyotrophe Lateralsklerose (321) aber auch Rückenmarksverletzungen (273).

6.5. Einfluss einer pharmakologischen Inhibition des p75NTR auf die neurotoxische Wirkung von Propofol nach SHT

Unsere Arbeitsgruppe konnte einen neurotoxischen Effekt ausgelöst bereits durch eine singuläre Propofol-Injektion 24 h nach experimentellem SHT feststellen. Dies äußert sich in einem vergrößerten Schadensareal, verstärkter Calpain-bedingter α 2-Spectrin-Spaltung sowie lokomotorischer Beeinträchtigung im CatWalk®-Test (25). Eine weitere Studie unseres Labors belegt zudem eine erhöhte Mortalitätsrate innerhalb der ersten vier Wochen nach CCI, neurologische Defizite als auch eine verminderte Neurogenese nach Propofol-Infusion in Ratten (24). Wir konnten zeigen, dass eine Propofol-Applikation zu einem weiteren Anstieg der p75NTR-Expression sowie zu einer Änderung des proBDNF/mBDNF Verhältnisses zugunsten der Pro-Form führt. Überdies belegt die Studie, dass der Zelltod besonders Neurone betrifft, da Immunfärbungen eine vermehrte Co-Lokalisation von TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)-positiven Zellen und Neuronen, weniger aber Astrozyten und Mikroglia nachweisen (25). All dies lässt darauf schließen, dass die neurotoxische Wirkung von Propofol in der Frühphase nach SHT zu einem erheblichen Teil über die Verbindung von Pro-Neurotrophinen und p75NTR und den daraufhin ausgelösten Signalkaskaden basiert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit untermauern diese These. Durch die vorangegangene Gabe von TAT-Pep5, dem intrazellulären p75NTR-Inhibitor, kommt es zu einer Aufhebung des neurotoxischen Effekts von Propofol, da die zuvor beobachtete Schadensvergrößerung durch Propofol ausbleibt. TAT-Pep5 verhindert die Interaktion von p75NTR und Rho-GDI und somit unterliegt das Zytoskelett keiner gesteigerten Destruktion mehr (322). Ähnliche Ergebnisse liefern *in vitro* und *in vivo* Experimente an neonatalen Mäusen, mit entwicklungsbedingt stark ausgebildetem p75NTR, denen Propofol nach entsprechender Vorbehandlung mit TAT-Pep5 appliziert wurde (22). Ein weiterer Hinweis auf die zentrale Rolle von p75NTR bei der Vermittlung Anästhetika-bedingter neurotoxischer Phänomene wird durch die Tatsache gegeben, dass sowohl junge als auch adulte p75NTR-KO-Tiere geschützt sind (22, 25).

Um die destabilisierende Auswirkung von Propofol auch in dieser Arbeit zu verdeutlichen, wurde für die Proteinanalyse eine Änderung im Gruppendesign vorgenommen und eine zusätzliche Kontrollgruppe mitgeführt, die nur die Trägersubstanz von Propofol appliziert bekamen. So sieht man erneut, dass Propofol im Vergleich zu seiner Vehikelsuspension Lipofundin die Calpain-Aktivität signifikant erhöht und daher zu verstärkten Zellverlusten

führt. Dieser Mechanismus unterliegt auch der Aktivierung von p75NTR, da es durch zusätzlich appliziertes TAT-Pep5 zu vergleichbaren α 2-Spectrin-Spaltfragment-Werten wie sie die Vehikelgruppe aufweist, kommt. Die Erhöhung der n-Zahl könnte hier möglicherweise zu einem signifikanten Unterschied führen. In Studien, die eine negative Korrelation zwischen Propofol und Calpain-Aktivität postulieren, wurde das Narkosemittel meist schon unmittelbar nach dem SHT bzw. der Ischämie injiziert, sodass es im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, die sich auf einen späteren Injektionszeitpunkt (24 h postoperativ) beziehen, zu einer Neuroprotektion kommt (323, 324). Die unterschiedlichen Euthanasie-Zeiten von 72 h und 30 h für die histologische Quantifizierung und den Protein-Nachweis sind der Vergleichbarkeit mit den Vordaten geschuldet (s. (25)).

Interessanterweise scheint die pharmakologische Blockade des p75NTR zwar Einfluss auf Kontusionsvolumen und Zelltod zu haben, die Auswirkungen auf die Neuro-Motorfunktion scheinen jedoch geringer zu sein und daher von weiteren Faktoren beeinflusst zu werden, da Propofol hier weiterhin im Trend zu einer Verschlechterung führt.

Während die intrazelluläre Hemmung dazu führt, dass p75NTR nicht weiter hochreguliert wird, scheint Propofol die Expression von BDNF zu verstärken. Dieser Effekt konnte bei gleicher Dosierung auch bei Ratten nach Ischämie festgestellt werden (325), steht aber in Kontrast zu Untersuchungen, die eine Verminderung von BDNF nach Propofol-Exposition angeben (218), wobei hier eine höhere Konzentration von 30 mg/kg eingesetzt wurde, die auch in der erstgenannten Studie zum gleichen Effekt führte. Eine genauere Unterscheidung, ob die Gabe von TAT-Pep5 auch das Spaltungsmuster von proBDNF zu mBDNF beeinflusst oder ob die verstärkte Expression lediglich als Reaktion auf die Inhibition des p75NTR angesehen werden kann, könnte im Western Blot überprüft werden.

Nachdem der Anästhetika-Einsatz bei Kleinkindern aufgrund neurotoxischer (Langzeit-) Auswirkungen bereits kritisch diskutiert wird (326-329), galt er bisher für den Erwachsenen als sicher (330, 331). In Anbetracht der Tatsache, dass nach zerebralen Insulten p75NTR erneut hochreguliert ist und Anästhetika-induzierte Neurotoxizität fördert, sollte diese Hypothese überdacht werden.

Aus veterinärmedizinischer Sicht konnte nach Propofol-Exposition nicht nur bei Labornagern sondern auch bei Fischen und Hühnern ein neurotoxischer Effekt nachgewiesen werden (222, 332).

Methodisch lassen sich abschließend noch folgende zwei Punkte diskutieren:

1) Um sicher zu gehen, dass es zu keiner Verwechslung der Spritzen gekommen ist und die Tiere wirklich Propofol erhalten haben, wurde bei allen Tieren protokolliert, ob sie in Narkose fielen oder nicht und anschließend mit der Randomisierungsliste die Übereinstimmung abgeglichen. Dies wurde von einer unabhängigen Person, die nur die Injektionen verblindet durchführte und mit dem weiteren Verlauf der Studie nichts zu tun hatte, ausgeführt, um eine Beeinflussung des Experimentators zu verhindern.

2) Das Tier, das in der Histologie-Studie am Morgen nach der OP tot im Käfig lag, muss im Verlauf der Nacht verstorben sein, da die Körperaußentemperatur schon stark vermindert war. Dies lässt darauf schließen, dass die Totenstarre schon wieder gelöst und der Tod somit schon mehrere Stunden vor dem Fund eingetreten ist. Nach experimentellem SHT können Komplikationen, wie z.B. eine Subarachnoidalblutung, eintreten (41). Da das Tier noch keine Testsubstanzen verabreicht bekommen hatte, die einen Einfluss auf das Versterben hätten haben können, wurde auf eine ausführliche pathologisch-anatomische Untersuchung verzichtet.

6.6. Einfluss einer genetischen Deletion des p75NTR-Co-Rezeptors Sortilin nach SHT

Sortilin wird in der Literatur häufig mit dem Absterben neuronaler Zellen in Verbindung gebracht (180, 333). Hierbei wird ihm die Funktion des Co-Rezeptors in dem Pro-Neurotrophin-p75NTR-Sortilin-Komplex zugeschrieben, der für die Bindung des Propeptidteils verantwortlich ist (19).

Ähnlich wie p75NTR ist Sortilin während der Synaptogenese (334) sowie nach verschiedenen Arten der Nervenschädigungen verstärkt exprimiert, was die Hypothese unterstützt, dass Sortilin an der Auslösung der Signalkaskaden beteiligt ist, die zum programmierten Zelltod führen (253, 335-337). Dies konnte jedoch in der Zeitreihen-Analyse unseres Labors zur mRNA-Expression von Neurotrophinrezeptoren in der ersten Woche nach CCI nicht bestätigt werden. (s. Abb. 8)

Analog zum Aufbau der Studien zur Untersuchung der Funktion von p75NTR nach experimentellem SHT wurden in einer weiteren Versuchsreihe die Auswirkungen einer genetischen Deletion des Sortilin-Rezeptors auf die Entstehung des Sekundärschadens untersucht. Erstaunlicherweise scheint Sortilin in adulten Mäusen nach SHT eine untergeordnete Rolle zu spielen, da das Kontusionsvolumen weder in der Frühphase (24 h) noch in der Spätphase (5 d) zwischen den KO-Mäusen und ihren WT-Wurfgeschwistern variiert. Einhergehend damit sind auch die neurologische und motorische Funktion sowie die inflammatorische Zytokin-Produktion nicht bzw. nur geringfügig durch Sortilin beeinflusst. Jansen et al. konnten jedoch ein neuroprotektives Muster bei den gleichen KO-Mäusen erkennen, deren corticospinale Motoneurone sich durch eine verminderte Sterberate nach Axotomie auszeichneten (18). Zum einen sind bei diesem Läsionsmodell andere Strukturen betroffen, zum anderen zeigten die KO-Mäuse nicht wie die WT-Kontrolltiere erhöhte pro-NGF- und p75NTR-Werte. Der Anstieg der p75NTR-Expression konnte allerdings in der vorliegenden Studie auch im KO-Tier nachgewiesen werden. Übereinstimmend mit Jansen et al. liegen aber im Nativtier vergleichbare p75NTR-Level vor, sodass es zu keiner Kompensation des Sortilin-Defizits durch eine Überexpression von p75NTR kommt. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützend führen Al-Shawi et al. an, dass Sortilin vor allem in alten Tieren (12-15 Monate) wichtig für die Pro-Neurotrophin-vermittelte Apoptose ist, in jungen Tieren, die in etwa der Altersklasse der hier eingesetzten Tiere entsprechen, erfüllt Sortilin diese Funktion eher weniger (176).

Die Hauptaufgabe von Sortilin ist seine Funktion als Sorting-Rezeptor. Zu den Interaktionspartnern gehören dabei auch die Trk-Rezeptoren (338). Eine Einschränkung der Sorting-Funktion durch die genetische Deletion von Sortilin könnte dazu führen, dass neurotrophe Rezeptoren vermindert an die Zelloberfläche transportiert werden, um dort ihre Funktion zu erfüllen. Obwohl die mRNA-Expressionswerte der untersuchten Neurotrophine und ihrer Rezeptoren keine Unterschiede zwischen den Genotypen zeigten, müsste die Ausbildung der Proteine und deren Lokalisation in bzw. auf den Neuronen mit Hilfe anderer Techniken abgeklärt werden, um diese Fragestellung abschließend beurteilen zu können.

Um die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen dieser Studie mit anderen Arbeiten zu erklären, sollten überdies die Tatsachen nicht außer Acht gelassen werden, dass obwohl IL-1 β die Präsentation von Sortilin an der Zelloberfläche fördert (339), der Großteil des Proteins jedoch intrazellulär vorliegt und somit die Möglichkeit der Rezeptorfusion mit p75NTR und Pro-Neurotrophinen an der Zelloberfläche eingeschränkt sein kann (166, 340). Andere Quellen belegen, dass p75NTR unabhängig von der Komplex-Bildung mit Sortilin in der Lage ist, eigenständig Apoptose zu initiieren (13) und sogar die Fähigkeit besitzt, ohne Liganden-Bindung in geringem Maße Zelltod zu vermitteln (296, 341).

In Anbetracht der Tatsache, dass in der KO-Maus im Western Blot eine schmale Bande detektiert werden kann, ist die kritische Analyse der eingesetzten KO-Maus ein verbleibender Diskussionspunkt. Die Neomycinkassette wurde in Exon 14 (von 21) inseriert (18). Möglicherweise kommt es zur Ausbildung eines trunkierten Proteins. Fehlgebildete Proteine werden in der Zelle schneller abgebaut, was die geringere Dicke der Western Blot Bande im Vergleich zur WT-Bande erklären kann. Der eingesetzte Antikörper bindet im Bereich der Aminosäuren 320-335, die Teil des extrazellulären Bereichs von Sortilin sind. Die Angaben zur Lokalisation der Neurotrophin-Bindungsstelle variieren je nach Quelle (165, 342) beziehen sich aber immer auf das vordere, N-terminale Drittel des Proteins, somit besteht die Möglichkeit, dass das nachgewiesene Protein in den KO-Tieren diese noch aufweist. Skeldal et al. führen an, dass der extrazelluläre Anteil von Sortilin für die Interaktion mit p75NTR nötig ist und nur die intrazelluläre Domäne für die Auslösung apoptotischer Signalwege wichtig ist (343). Der intrazelluläre Part des Rezeptors sollte in den KO-Mäusen definitiv nicht ausgebildet sein und die Tiere müssten daher einen kleineren Sekundärschaden aufweisen. Die vorliegenden Daten können diese These aufgrund des fehlenden Effekts in Sortilin-defizienten Tieren somit nicht verifizieren.

6.7. Diskussion ausgewählter methodischer Aspekte

6.7.1. Analgesie

Eine adäquate analgetische Behandlung im Rahmen operativer Eingriffe ist sowohl aus ethischen Gründen als auch gemäß §1 und §7a des TSchG in Verbindung mit Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde - Society for Laboratory Animal Science (GV-SOLAS) sicherzustellen. Abweichend davon kann in begründeten Fällen von einer Analgesie abgesehen werden (226, 230). Das CCI wird als Standard-Verfahren zur Erzeugung eines experimentellen SHT in Nagetieren eingesetzt, um zugrundeliegende Pathogenitätsmechanismen zu erforschen und neue Prophylaxe- und Therapieoptionen zu etablieren. Daher wird der Einsatz von analgetischen Substanzen wissenschaftlich kontrovers diskutiert, da die eingesetzten pharmakologischen Substanzen zu einer Beeinträchtigung von (patho-)physiologischen Vorgängen führen können (344). In anderen SHT-Modellen beeinflussten Carprofen bzw. Inhibitoren der Cyclooxygenase-2 die Gliogenese, die kognitive Funktion sowie die Caspase-Aktivität (345-347). Zudem können Wechselwirkungen zwischen den zu testenden Substanzen und den Analgetika nicht ausgeschlossen werden. Ungeachtet davon ist es wichtig, für jedes einzelne Tiermodell die tatsächliche Belastung festzustellen und eine Kosten/Nutzen-Abwägung durchzuführen, um anschließend eine Entscheidung zu treffen, die dem Tierwohl als auch dem wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn gleichermaßen Rechnung trägt. Um die bisher fehlenden evidenzbasierten Daten zum Einfluss einer perioperativen Analgesie nach CCI zu ermitteln, wurde in unserem Labor eine Studie durchgeführt, die zeigt, dass prä- und postoperative Gaben von verschiedenen Analgetika (Buprenorphin, Carprofen oder Meloxicam) keine positiven Auswirkungen auf das Wohlbefinden der Versuchstiere haben. Im Gegensatz dazu bewirkte eine analgetische Behandlung nach experimenteller Subarachnoidalblutung eine deutliche Verbesserung. Die dafür erhobenen Parameter umfassen neben der Analyse des Körpergewichts, der Futteraufnahme und des neurologischen Status auch einen Komfortscore. Dieser adressiert vor allem Verhaltensweisen, die mit Schmerzen und Leiden assoziiert sind (z.B. Nestbauverhalten, Zähneknirschen, Fellpflegeaktivität). Zwar kommt es in Folge des Eingriffes zu einer Beeinträchtigung der untersuchten Parameter, die im CCI-Modell jedoch unabhängig von der Gabe von Schmerzmitteln ist.(348).

Überdies stellt auch die Applikation der Analgetika eine Manipulation des Versuchstiers dar, die neben dem damit verbundenen Stress auch den Injektionsschmerz verursacht und das Risiko einer Entzündung birgt. Obwohl es in der Studie unserer Arbeitsgruppe zu keiner

weiteren Abnahme der Futteraufnahmen kam, führt Buprenorphin sowohl in klinischen Beobachtungen als auch in anderen Studien zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme (349, 350).

Da wir keine positive Auswirkung durch die Gabe von Analgetika auf das Wohlbefinden der Tiere nach CCI ermitteln konnte, verzichteten wir auf deren Einsatz, um die pharmakologische Beeinträchtigung unserer Studien durch etwaige neuroprotektive oder –toxische Effekte der eingesetzten analgetischen Substanzen zu vermeiden und die Tiere nicht zusätzlich dem mit der Injektion verbundenen Stress auszusetzen.

6.7.2. Anästhesie:

Isofluran ist ein in der Veterinärmedizin häufig eingesetztes Anästhetikum, das aufgrund seiner schnellen An- und Abflutung gut steuerbar ist und auch für wiederholte Narkosen eingesetzt werden kann (351, 352). Obwohl bekannt ist, dass Isofluran die neuronale Homöostase, Puls und Blutdruck beeinflussen kann (353, 354), ist es obsolet bei einem operativen Eingriff wie einem CCI auf eine Narkose zu verzichten. Der Effekt sollte aber bei allen Versuchsgruppen derselbe sein, sodass nur der unterschiedliche Genotyp oder die postoperativ verabreichte Substanz (Propofol, Lipofundin, TAT-Pep5, TAT-Ctrl) den Unterschied in den untersuchten Parametern bedingen sollten. Unsere Arbeitsgruppe konnte überdies zeigen, dass Puls, Atemfrequenz und systolischer Blutdruck sowohl nach Injektion von Propofol als auch von Lipofundin physiologische Werte aufweisen und die Gruppen sich untereinander nicht signifikant voneinander unterscheiden (25).

7. Zusammenfassung

Das SHT gilt als die häufigste Todesursache des jungen Erwachsenen und ist auch in der veterinärmedizinischen Praxis oftmals Vorstellungsgrund von Klein- und Großtieren. Die Therapie besteht bisher vornehmlich aus der Akutversorgung der Patienten und somit beschäftigt sich die Forschung mit der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, deren besonderes Augenmerk auf der Reduktion des sekundären Schadenswachstums liegt.

Der p75NTR steht im Fokus dieser Arbeit. Er ist nur während der Synaptogenese vermehrt in Neuronen exprimiert und wird erst infolge eines SHT erneut hochreguliert. Über die Bindung von Neurotrophinen kann er neuronale Apoptose auslösen. Neurotrophine werden als Pro-Form sezerniert und im synaptischen Spalt enzymatisch in ihre mature Form gespalten. Nach zerebralen Insulten oder unter Anästhetika-Einfluss kommt es zu einer Dysregulation, die mit einer Konzentrationserhöhung der Pro-Form einhergeht.

Die für diese Arbeit eingesetzten Mäuse sind gekennzeichnet durch eine Modifizierung des p75NTR, was zu einem Verlust der Bindungsstelle von Neurotrophinen führt. Als Modell für ein experimentelles SHT wurde das CCI gewählt.

Die über die Bindung von Pro-Neurotrophinen an p75NTR ausgelösten apoptotischen Signalkaskaden kristallisieren sich als zentrales Element bei der Entstehung des Sekundärschadens heraus, da sowohl in der Akutphase 24 h postoperativ als auch nach einer verlängerten Überlebenszeit von 5 d die KO-Tiere ein verringertes Läsionsvolumen zeigen. Zudem weisen sie eine verbesserte motorische Funktion, eine weniger starke postoperative Beeinträchtigung aufgrund eines geringeren Gewichtsverlusts und verminderten Zelltod im Vergleich mit ihren WT-Wurfgeschwistern auf. Die schnellere Regeneration der KO-Tiere spiegelt sich auch in einer reduzierten pro-inflammatorischen Zytokinproduktion (*il-6*) sowie einer früher einsetzenden Re-Expression neurotropher Rezeptoren und Effektormoleküle (*trk b* und *bdnf*) wider.

TAT-Pep5, das als intrazellulärer Inhibitor des p75NTR wirkt, bedingt nach i.v. und s.c. Injektion einen dosisabhängigen neuroprotektiven Effekt, was sich in einer Verringerung des Kontusionsvolumens nach Gabe von 10 µM TAT-Pep5 niederschlägt.

Propofol wirkt im adulten Tier nach experimentellem SHT neurotoxisch indem es die Transformation von Pro-Neurotrophinen in ihre mature Form beeinträchtigt, sodass vermehrt Pro-Neurotrophine an p75NTR binden und Zelltod auslösen können. Gegenstand dieser

Arbeit ist es die Rolle von p75NTR hierbei näher zu beleuchten und es zeigt sich, dass die Hemmung durch TAT-Pep5 Gabe zur Egalisierung des nervenschädigenden Effekts führt und somit eine direkte Verbindung zwischen Propofol-Neurotoxizität und den durch p75NTR ausgelösten Signalwegen besteht.

Die in der Literatur beschriebene essenzielle Funktion von Sortilin als Co-Rezeptor des p75NTR-Sortilin-Pro-Neurotrophin-Komplexes kann nicht mit den hier vorliegenden Daten in Einklang gebracht werden. Die fehlende Beeinträchtigung der Parameter Läsionsvolumen, neurologische und motorische Funktion durch eine genetische Deletion von Sortilin sowie die nur geringe Beeinflussung der Expressionsmuster von Inflammationsparametern und Neurotrophinen und ihren Rezeptoren in Früh- und Spätphase nach experimentellem SHT lässt auf eine untergeordnete Relevanz von Sortilin bei der Ausbildung des Sekundärschadens schließen.

Abschließend lässt sich festhalten, dass sowohl die genetische Deletion als auch die pharmakologische Inhibition des p75NTR vielversprechende Ergebnisse bei der Reduktion des Sekundärschadens liefern. Die Verbesserung der neurologischen und motorischen Fähigkeiten und die Verminderung der durch Propofol induzierten posttraumatischen Neurotoxizität sind die herausragenden Eigenschaften, die p75NTR als interessanten therapeutischen Angriffspunkt für die Behandlung von SHT-Patienten auszeichnen. Besonders da TAT-Fusionsproteine i.v. appliziert werden können und zuletzt auch kleine nicht-peptidale Moleküle entdeckt wurden, die p75NTR erfolgreich inhibieren können.

8. Summary

Traumatic brain injury (TBI) is the leading cause of high mortality among young adults and is also seen regularly in veterinarian clinics as reason for consultation. Initial therapy mainly targets patient's acute intervention. Therefore, research is focused on the development of new therapeutic approaches addressing the reduction of the secondary brain damage formation.

This work focuses on p75NTR, which is highly expressed only during synaptogenesis and is again upregulated following TBI. Binding of its ligands, the neurotrophins, leads to neuronal apoptosis. Neurotrophins are released as pro-neurotrophins into the synaptic cleft where they are enzymatically cleaved into their mature forms. Dysregulation and augmented pro-neurotrophin concentration is seen following cerebral insults and under the influence of anesthetics.

The genetic modification of the mice used in this study, leads to a deletion of the p75NTR's ligand-binding domain. CCI was used as experimental TBI model.

Apoptotic signal cascades, set off by the binding of pro-neurotrophins to p75NTR, seem to be crucial for the expansion of the secondary damage. This is proved by the fact that KO-animals display smaller lesion size in the acute phase 24 h post surgery and after an expanded survival period of 5 d. Moreover they show improved motor function, less post-surgical impairment indicated by reduced loss of weight and decreased cell death when compared to their wildtype littermates. Reduced pro-inflammatory cytokine production (IL-6) and faster onset of the re-expression of neurotrophic receptors and effector molecules (Trk B and BDNF) reflect the ameliorated recovery of KO-animals.

TAT-Pep5, an intracellular inhibitor of p75NTR, has a dose-dependent neuroprotective effect that is revealed by a decreased contusion volume after i.v. and s.c. injection of 10 μ M TAT-Pep5.

Propofol shows neurotoxic potential in adult animals after CCI by impairing the transformation of the pro-neurotrophins into their mature forms, leading to augmented binding of pro-neurotrophins to p75NTR followed by increased apoptosis. Part of this work is to elucidate the role of p75NTR in this context and it could be seen that inhibition by TAT-Pep5 neutralize the neurotoxic effect of propofol, proving the role of p75NTR signaling in propofol neurotoxicity.

The decisive function of sortilin as co-receptor in the p75NTR-sortilin-pro-neurotrophin-complex, as described in literature, cannot be conciliated with the present data. Missing influence of a genetic deletion of sortilin on lesion volume, neurological and motor function and the minor changes in inflammatory gene expression as well as neurotrophins and their receptors in the early and late phase after experimental TBI indicate an inferior role for sortilin's contribution to secondary brain damage formation.

Concluding that genetic deletion as well as pharmacological blocking of p75NTR provides promising results p75NTR can be seen as an interesting therapeutic target for the treatment of patients suffering from TBI. Reduction of the secondary damage, improvement of neurological and motorfunctional outcome and reduction of the posttraumatic neurotoxicity of propofol reveal the most outstanding features of inhibiting the function of p75NTR. Additionally TAT-fusion proteins as TAT-Pep5 can be administered i.v. and recently even small non-peptidal molecules have been detected that inhibit p75NTR successfully.

9. Veröffentlichung der Ergebnisse

9.1. Journal-Artikel

Sebastiani A*, **Gölz C***, Werner C, Schäfer MK, Engelhard K, Thal SC. Proneurotrophin Binding to P75 Neurotrophin Receptor (P75ntr) Is Essential for Brain Lesion Formation and Functional Impairment after Experimental Traumatic Brain Injury. Journal of neurotrauma. 2015. (*equally contributing)

Sebastiani A, Granold M, Ditter A, Sebastiani P, **Gölz C**, Pöttker B, et al. Posttraumatic Propofol Neurotoxicity Is Mediated via the Pro-Brain-Derived Neurotrophic Factor-p75 Neurotrophin Receptor Pathway in Adult Mice. Critical care medicine. 2015.

9.2. Kongress-Abstracts

Gölz C, Sebastiani A, Luh C, Schaible EV, Werner C, Schäfer MK, Engelhard K, Thal SC. Rolle von p75 Neurotrophinrezeptor (p75NTR) nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma. Hauptstadtkongress der DGAI für Anästhesiologie und Intensivmedizin 2014; freier Vortrag

Sebastiani A, **Gölz C**, Schaible E, Luh C., Schäfer M, Werner C, Engelhard K, Thal S: The p75 neurotrophin receptor (p75NTR) is essential for secondary brain damage formation after experimental TBI. J Neurosurg Anesthesiol 2014, 26 (4): 478

42nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience in Anaesthesiology and Critical Care; New Orleans, Louisiana; Oktober 2014

A. Sebastiani, M. Granold, **C. Gölz**, B. Pöttker, M. Schäfer, C. Werner, K. Engelhard, B. Moosmann, S. Thal: Posttraumatische Propofolgabe führt über proBDNF-p75NTR vermittelte Signalwege zu gesteigertem Zelltod, vergrößertem Schadensvolumen und motorischen Funktionsstörungen. Anästh Intensivmed 2015, 56:S416

Deutscher Anästhesie Congress; Düsseldorf; Mai 2015

A. Sebastiani, M. Granold, **C. Gölz**, B. Pöttker, M. Schäfer, C. Werner, K. Engelhard, B. Moosmann, S. Thal: Posttraumatic propofol-neurotoxicity is mediated via ProBDNF-p75NTR pathway

45th Annual Meeting of the Society for Neuroscience; Chicago, Illinois; Oktober 2015

10. Anhang

10.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklung des Sekundärschadens (modifiziert nach Yang (54))	8
Abbildung 2: Fluid-Percussion-Modell (modifiziert nach Xiong (5))	14
Abbildung 3: Wirkungsweise von Neurotrophinen (modifiziert nach Nykjaer (19))	17
Abbildung 4: Neurotrophin mRNA-Expression (94)	18
Abbildung 5: Neurotrophe Funktionsweise des p75NTR	21
Abbildung 6: Trk-Rezeptor mRNA-Expression (94)	23
Abbildung 7: p75NTR mRNA-Expression (94)	24
Abbildung 8: Sortilin mRNA-Expression	24
Abbildung 9: Strukturformel Propofol (182)	25
Abbildung 10: Auswirkung einer posttraumatischen Propofolgabe	28
Abbildung 11: Operations-Platz	48
Abbildung 12: Freigelegter Schädelknochen	50
Abbildung 13: Eröffnetes Schädelfenster	50
Abbildung 14: Schematische Darstellung des CCI-Operationssitus modifiziert nach Onyszchuk (236)	51
Abbildung 15: Aufsicht auf traumatisiertes Gehirn (Schadensareal in Rot)	53
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Hirnprozessierung in der Gehirnmatrix	54
Abbildung 17: Kontusionsvolumenbestimmung am Nissl gefärbten Schnitt	56
Abbildung 18: Neuroscore – Koordinations-Test	58
Abbildung 19: Rota-Rod	61
Abbildung 20: Blot Aufbau	72
Abbildung 21: Studiendesign p75NTR 5 d	76
Abbildung 22: Studiendesign TAT-Pep5 24 h	77
Abbildung 23: Studiendesign TAT-Pep5 / Propofol 72 h	79
Abbildung 24: Studiendesign TAT-Pep5 / Propofol 30 h (Proteinanalyse)	80
Abbildung 25: Studiendesign Sortilin 5 d	82
Abbildung 26: <i>p75ntr</i> mRNA-Expression in den unterschiedlichen p75NTR-Genotypen	84
Abbildung 27: Western Blot Analyse zur Verifizierung des Sortilin-KO	85
Abbildung 28: p75NTR-Protein-Expression an Tag 1 und 5 nach CCI in % nativ	86
Abbildung 29: Sortilin-Protein-Expression an Tag 1 und 5 nach CCI in % nativ	87

Abbildung 30: α 2-Spectrin-Fragment-Protein-Expression an Tag 1 und 5 nach CCI in % nativ	87
Abbildung 31: Neuroscore p75NTR 1d und 5 d	88
Abbildung 32: Rota-Rod Analyse p75NTR 1 d und 5 d	89
Abbildung 33: Gewichtsentwicklung p75NTR 1 d und 5 d	89
Abbildung 34: Kontusionsvolumen p75NTR 24 h (Nissl-Färbung)	90
Abbildung 35: Kontusionsvolumen p75NTR 5 d (Nissl-Färbung)	90
Abbildung 36: Inflammationsparameter p75NTR 24 h	91
Abbildung 37: Inflammationsparameter p75NTR 5 d	92
Abbildung 38: Expression des p75NTR in WT-Tieren	92
Abbildung 39: Neurotrophine und ihre Rezeptoren p75NTR 24 h	93
Abbildung 40: Neurotrophine und ihre Rezeptoren p75NTR 5 d	94
Abbildung 41: Spectrin Western Blot p75NTR 24 h	95
Abbildung 42: Neuroscore TATPep5 24h Abbildung 43: Gewichtsverlust TATPep5 24h..	96
Abbildung 44: Kontusionsvolumen TAT-Pep5 24 h (Nissl-Färbung)	97
Abbildung 45: Neuroscore TAT-Pep5 + Propofol nach 24 h und 72 h	98
Abbildung 46: Rota-Rod TAT-Pep5 + Propofol nach 24 h und 72h	99
Abbildung 47: Gewichtsentwicklung TAT-Pep5 + Propofol nach 24 h und 72 h	99
Abbildung 48: Kontusionsvolumen TAT-Pep5 + Propofol 72 h (Nissl-Färbung)	100
Abbildung 49: Inflammationsparameter TAT-Pep5 + Propofol 72 h	101
Abbildung 50: Neurotrophine und ihre Rezeptoren TAT-Pep5 + Propofol 72 h	102
Abbildung 51: Spectrin-WB TAT-Pep5+Propofol 30 h	103
Abbildung 52: Neuroscore Sortilin mach 1 d und 5 d	104
Abbildung 53: Rota-Rod Sortilin nach 1 d und 5 d	105
Abbildung 54: Gewicht Sortilin nach 1 d und 5 d	105
Abbildung 55: Kontusionsvolumen Sortilin 24 h (Nissl-Färbung)	106
Abbildung 56: Kontusionsvolumen Sortilin 5 d (Nissl-Färbung)	106
Abbildung 57: Inflammationsparameter Sortilin 24 h	107
Abbildung 58: Neurotrophine und ihre Rezeptoren Sortilin 24 h	108
Abbildung 59: Einfluss des SHT auf die Funktionsweise von p75NTR	114

10.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: MGCS (modifiziert nach Platt(88))	11
Tabelle 2: Materialauflistung – Geräte.....	30
Tabelle 3: Materialauflistung – Medikamente	32
Tabelle 4: Materialauflistung – Chemische Substanzen	32
Tabelle 5: Materialauflistung – Puffer, Reagenzien und Lösungen	34
Tabelle 6: Materialauflistung – Polymerase Kettenreaktion (PCR) Kits	35
Tabelle 7: Materialauflistung – Primer und Sonden	36
Tabelle 8: Materialauslistung – Primäre Antikörper.....	38
Tabelle 9: Materialauflistung - Sekundäre Antikörper	38
Tabelle 10: Materialauflistung - Verbrauchsmaterialien.....	39
Tabelle 11: Materialauflistung – Software.....	40
Tabelle 12: Genotypisierung p75NTR - PCR Banden	43
Tabelle 13: Genotypisierung Sortilin - PCR Banden	44
Tabelle 14: Parameter zu Haltung von Labormäusen	46
Tabelle 15: Neuroscore-Protokoll	60
Tabelle 16: PCR Assays und Annealingtemperaturen	67
Tabelle 17: Pipettierschemata für PCR	68
Tabelle 18: Pipettierschema für 2 SDS-Gele 10 %	71
Tabelle 19: Gruppendesign p75NTR 24 h (Histologie).....	75
Tabelle 20: Gruppendesign p75NTR 24 h (Molekularbiologie).....	75
Tabelle 21: Gruppendesign p75NTR 5 d	76
Tabelle 22: Gruppendesign TAT-Pep5 24 h	77
Tabelle 23: Gruppendesign TAT-Pep5 / Propofol 72 h (Histologie).....	79
Tabelle 24: Gruppendesign TAT-Pep5 / Propofol 30 h (Proteinanalyse).....	80
Tabelle 25: Gruppendesign Sortilin 24 h (Histologie).....	81
Tabelle 26: Gruppendesign Sortilin 24 h (Molekularbiologie).....	81
Tabelle 27: Gruppendesign Sortilin 5 d	82

11. Literaturverzeichnis

1. Langlois JA, Rutland-Brown W, Wald MM. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *The Journal of head trauma rehabilitation*. 2006;21(5):375-8.
2. Todesursachen in Deutschland 2012, Fachserie 12 Reihe 4: Statistisches Bundesamt, Wiesbaden; 2013.
3. Ponsford JL, Spitz G, Cromarty F, Gifford D, Attwood D. Costs of care after traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*. 2013;30(17):1498-505.
4. Syring RS, Otto CM, Drobatz KJ. Hyperglycemia in dogs and cats with head trauma: 122 cases (1997-1999). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2001;218(7):1124-9.
5. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury. *Nature reviews Neuroscience*. 2013;14(2):128-42.
6. Longo FM, Massa SM. Neurotrophin-based strategies for neuroprotection. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2004;6(6 Suppl):S13-7.
7. Frade JM, Barde YA. Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord. *Development (Cambridge, England)*. 1999;126(4):683-90.
8. Volosin M, Trotter C, Cragolini A, Kenchappa RS, Light M, Hempstead BL, et al. Induction of proneurotrophins and activation of p75NTR-mediated apoptosis via neurotrophin receptor-interacting factor in hippocampal neurons after seizures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008;28(39):9870-9.
9. Bentley CA, Lee KF. p75 is important for axon growth and schwann cell migration during development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000;20(20):7706-15.
10. Agerman K, Baudet C, Fundin B, Willson C, Ernfors P. Attenuation of a caspase-3 dependent cell death in NT4- and p75-deficient embryonic sensory neurons. *Molecular and cellular neurosciences*. 2000;16(3):258-68.
11. Roux PP, Colicos MA, Barker PA, Kennedy TE. p75 neurotrophin receptor expression is induced in apoptotic neurons after seizure. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1999;19(16):6887-96.
12. Shulga A, Magalhaes AC, Autio H, Plantman S, di Lieto A, Nykjaer A, et al. The loop diuretic bumetanide blocks posttraumatic p75NTR upregulation and rescues injured neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012;32(5):1757-70.
13. Underwood CK, Coulson EJ. The p75 neurotrophin receptor. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2008;40(9):1664-8.
14. Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *British journal of anaesthesia*. 2007;99(1):4-9.
15. Cernak I. Animal models of head trauma. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2005;2(3):410-22.
16. Dechant G, Barde YA. The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nature neuroscience*. 2002;5(11):1131-6.
17. Casaccia-Bonnel P, Carter BD, Dobrowsky RT, Chao MV. Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature*. 1996;383(6602):716-9.
18. Jansen P, Giehl K, Nyengaard JR, Teng K, Lioubinski O, Sjoegaard SS, et al. Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury. *Nature neuroscience*. 2007;10(11):1449-57.

19. Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, et al. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*. 2004;427(6977):843-8.
20. Glowaski MM, Wetmore LA. Propofol: application in veterinary sedation and anesthesia. *Clin Tech Small Anim Pract*. 1999;14(1):1-9.
21. Neuhäuser C, Wagner B, Heckmann M, Weigand MA, Zimmer K-P. Analgosedierung für schmerzhaftes Eingriffe bei Kindern und Jugendlichen. *Dtsch Arztebl International*. 2010;107(14):241-7.
22. Pearn ML, Hu Y, Niesman IR, Patel HH, Drummond JC, Roth DM, et al. Propofol neurotoxicity is mediated by p75 neurotrophin receptor activation. *Anesthesiology*. 2012;116(2):352-61.
23. Lemkuil BP, Head BP, Pearn ML, Patel HH, Drummond JC, Patel PM. Isoflurane neurotoxicity is mediated by p75NTR-RhoA activation and actin depolymerization. *Anesthesiology*. 2011;114(1):49-57.
24. Thal SC, Timaru-Kast R, Wilde F, Merk P, Johnson F, Frauenknecht K, et al. Propofol impairs neurogenesis and neurologic recovery and increases mortality rate in adult rats after traumatic brain injury. *Critical care medicine*. 2014;42(1):129-41.
25. Sebastiani A, Granold M, Ditter A, Sebastiani P, Gözl C, Pöttker B, et al. Posttraumatic Propofol Neurotoxicity Is Mediated via the Pro-Brain-Derived Neurotrophic Factor-p75 Neurotrophin Receptor Pathway in Adult Mice. *Critical care medicine*. 2015.
26. König HE, Liebich H-G. Anatomie der Haussäugetiere. 3. Auflage ed: Schattauer; 2005.
27. Schiebeler TH. Anatomie. 9. Auflage ed: Springer; 2005.
28. Trepel M. Neuroanatomie. 4. Auflage ed: Elsevier GmbH,, Urban & Fischer Verlag; 2008.
29. Liebich H-G. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. 4. Auflage ed: Schattauer; 2004.
30. Tennant KA, Adkins DL, Donlan NA, Asay AL, Thomas N, Kleim JA, et al. The organization of the forelimb representation of the C57BL/6 mouse motor cortex as defined by intracortical microstimulation and cytoarchitecture. *Cereb Cortex*. 2011;21(4):865-76.
31. Warner-Schmidt JL, Duman RS. Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus*. 2006;16(3):239-49.
32. Bois C, Levita L, Ripp I, Owens DC, Johnstone EC, Whalley HC, et al. Hippocampal, amygdala and nucleus accumbens volume in first-episode schizophrenia patients and individuals at high familial risk: A cross-sectional comparison. *Schizophr Res*. 2015.
33. D'Alessio L, Konopka H, Escobar E, Acuna A, Oddo S, Solis P, et al. Dentate gyrus expression of nestin-immunoreactivity in patients with drug-resistant temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis. *Seizure*. 2015;27:75-9.
34. Yi HA, Moller C, Dieleman N, Bouwman FH, Barkhof F, Scheltens P, et al. Relation between subcortical grey matter atrophy and conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015.
35. Cloots RJ, Gervaise HM, van Dommelen JA, Geers MG. Biomechanics of traumatic brain injury: influences of the morphologic heterogeneities of the cerebral cortex. *Ann Biomed Eng*. 2008;36(7):1203-15.
36. Herculano-Houzel S. The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Front Hum Neurosci*. 2009;3:31.
37. Herculano-Houzel S, Mota B, Lent R. Cellular scaling rules for rodent brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(32):12138-43.
38. Coronado VG, Xu L, Basavaraju SV, McGuire LC, Wald MM, Faul MD, et al. Surveillance for traumatic brain injury-related deaths--United States, 1997-2007. *Morbidity*

- and mortality weekly report Surveillance summaries (Washington, DC : 2002). 2011;60(5):1-32.
39. Sande A, West C. Traumatic brain injury: a review of pathophysiology and management. *Journal of veterinary emergency and critical care*. 2010;20(2):177-90.
40. Gaetz M. The neurophysiology of brain injury. *Clin Neurophysiol*. 2004;115(1):4-18.
41. Kim JJ, Gean AD. Imaging for the diagnosis and management of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*. 2011;8(1):39-53.
42. Bramlett HM, Dietrich WD. Progressive damage after brain and spinal cord injury: pathomechanisms and treatment strategies. *Prog Brain Res*. 2007;161:125-41.
43. Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL. Edema and brain trauma. *Neuroscience*. 2004;129(4):1021-9.
44. Donkin JJ, Vink R. Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments. *Current opinion in neurology*. 2010;23(3):293-9.
45. Kenney K, Amyot F, Haber M, Pronger A, Bogoslovsky T, Moore C, et al. Cerebral Vascular Injury in Traumatic Brain Injury. *Experimental neurology*. 2015.
46. Glushakova OY, Johnson D, Hayes RL. Delayed increases in microvascular pathology after experimental traumatic brain injury are associated with prolonged inflammation, blood-brain barrier disruption, and progressive white matter damage. *Journal of neurotrauma*. 2014;31(13):1180-93.
47. Szydlowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell calcium*. 2010;47(2):122-9.
48. Moretti R, Zanin A, Pansiot J, Spiri D, Manganozzi L, Kratzer I, et al. Melatonin reduces excitotoxic blood-brain barrier breakdown in neonatal rats. *Neuroscience*. 2015.
49. Mokri B. The Monro-Kellie hypothesis: applications in CSF volume depletion. *Neurology*. 2001;56(12):1746-8.
50. Brown SA, Hall ED. Role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of shock and trauma, with focus on central nervous system injuries. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1992;200(12):1849-59.
51. Gottron FJ, Ying HS, Choi DW. Caspase inhibition selectively reduces the apoptotic component of oxygen-glucose deprivation-induced cortical neuronal cell death. *Molecular and cellular neurosciences*. 1997;9(3):159-69.
52. Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *British journal of pharmacology*. 2006;147 Suppl 1:S232-40.
53. Bullock R, Zauner A, Woodward JJ, Myseros J, Choi SC, Ward JD, et al. Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. *Journal of neurosurgery*. 1998;89(4):507-18.
54. Yang D. Einfluss des P2Y12 Rezeptors auf den sekundären Hirnschaden nach Schädel-Hirn-Trauma in Mäusen. Influence of the P2Y12 receptor on secondary brain damage after traumatic brain injury in mice, unveröffentlichte Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2012.
55. Nortje J, Menon DK. Traumatic brain injury: physiology, mechanisms, and outcome. *Current opinion in neurology*. 2004;17(6):711-8.
56. DiFazio J, Fletcher DJ. Updates in the management of the small animal patient with neurologic trauma. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice*. 2013;43(4):915-40.
57. Tagliaferri F, Compagnone C, Korsic M, Servadei F, Kraus J. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta neurochirurgica*. 2006;148(3):255-68; discussion 68.
58. Rickels E, von Wild K, Wenzlaff P. Head injury in Germany: A population-based prospective study on epidemiology, causes, treatment and outcome of all degrees of head-injury severity in two distinct areas. *Brain injury*. 2010;24(12):1491-504.

59. Faul M XL, Wald MM, Coronado VG. Traumatic Brain Injury in the United States: Emergency Department Visits, Hospitalizations and Deaths 2002–2006. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Injury Prevention and Control; 2010.
60. Harvey LA, Close JC. Traumatic brain injury in older adults: characteristics, causes and consequences. *Injury*. 2012;43(11):1821-6.
61. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet*. 1974;2(7872):81-4.
62. Holmes JF, Palchak MJ, MacFarlane T, Kuppermann N. Performance of the pediatric glasgow coma scale in children with blunt head trauma. *Acad Emerg Med*. 2005;12(9):814-9.
63. Huang YH, Deng YH, Lee TC, Chen WF. Rotterdam computed tomography score as a prognosticator in head-injured patients undergoing decompressive craniectomy. *Neurosurgery*. 2012;71(1):80-5.
64. Maas AI, Hukkelhoven CW, Marshall LF, Steyerberg EW. Prediction of outcome in traumatic brain injury with computed tomographic characteristics: a comparison between the computed tomographic classification and combinations of computed tomographic predictors. *Neurosurgery*. 2005;57(6):1173-82; discussion -82.
65. Te Ao B, Brown P, Tobias M, Ameratunga S, Barker-Collo S, Theadom A, et al. Cost of traumatic brain injury in New Zealand: Evidence from a population-based study. *Neurology*. 2014;83(18):1645-52.
66. Berg J, Tagliaferri F, Servadei F. Cost of trauma in Europe. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 2005;12 Suppl 1:85-90.
67. Olesen J, Gustavsson A, Svensson M, Wittchen HU, Jonsson B. The economic cost of brain disorders in Europe. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 2012;19(1):155-62.
68. Scholten AC, Haagsma JA, Panneman MJ, van Beeck EF, Polinder S. Traumatic brain injury in the Netherlands: incidence, costs and disability-adjusted life years. *PloS one*. 2014;9(10):e110905.
69. Cancelliere C, Kristman VL, Cassidy JD, Hincapie CA, Cote P, Boyle E, et al. Systematic review of return to work after mild traumatic brain injury: results of the International Collaboration on Mild Traumatic Brain Injury Prognosis. *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 2014;95(3 Suppl):S201-9.
70. Zumstein MA, Moser M, Mottini M, Ott SR, Sadowski-Cron C, Radanov BP, et al. Long-term outcome in patients with mild traumatic brain injury: a prospective observational study. *The Journal of trauma*. 2011;71(1):120-7.
71. Andelic N, Hammergren N, Bautz-Holter E, Sveen U, Brunborg C, Roe C. Functional outcome and health-related quality of life 10 years after moderate-to-severe traumatic brain injury. *Acta Neurol Scand*. 2009;120(1):16-23.
72. Sinha S, Gunawat P, Nehra A, Sharma BS. Cognitive, functional, and psychosocial outcome after severe traumatic brain injury: a cross-sectional study at a tertiary care trauma center. *Neurol India*. 2013;61(5):501-6.
73. Lowenstein DH. Epilepsy after head injury: an overview. *Epilepsia*. 2009;50 Suppl 2:4-9.
74. Gardner RC, Burke JF, Nettiksimmons J, Goldman S, Tanner CM, Yaffe K. Traumatic brain injury in later life increases risk for Parkinson disease. *Annals of neurology*. 2015;77(6):987-95.
75. Donovan J, Cancelliere C, Cassidy JD. Summary of the findings of the International Collaboration on Mild Traumatic Brain Injury Prognosis. *Chiropractic & manual therapies*. 2014;22(1):38.

76. Kolata RJ. Trauma in dogs and cats: an overview. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice*. 1980;10(3):515-22.
77. Simpson SA, Syring R, Otto CM. Severe blunt trauma in dogs: 235 cases (1997-2003). *Journal of veterinary emergency and critical care*. 2009;19(6):588-602.
78. MacKay RJ. Brain injury after head trauma: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *The Veterinary clinics of North America Equine practice*. 2004;20(1):199-216.
79. Scrivani P. Neuroimaging in horses with traumatic brain injury. *Equine Veterinary Education*. 2013;25:499-502.
80. Siegel JH. The effect of associated injuries, blood loss, and oxygen debt on death and disability in blunt traumatic brain injury: the need for early physiologic predictors of severity. *Journal of neurotrauma*. 1995;12(4):579-90.
81. Feary DJ, Magdesian KG, Aleman MA, Rhodes DM. Traumatic brain injury in horses: 34 cases (1994-2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2007;231(2):259-66.
82. Dewey CW. Emergency management of the head trauma patient. Principles and practice. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice*. 2000;30(1):207-25, vii-viii.
83. Schrey CF. Notfalltherapie in der Kleintierpraxis. 2. Auflage ed: Schattauer; 2009.
84. Friedenberg SG, Butler AL, Wei L, Moore SA, Cooper ES. Seizures following head trauma in dogs: 259 cases (1999-2009). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2012;241(11):1479-83.
85. Steinmetz S, Tipold A, Loscher W. Epilepsy after head injury in dogs: a natural model of posttraumatic epilepsy. *Epilepsia*. 2013;54(4):580-8.
86. Grohmann KS, Schmidt MJ, Moritz A, Kramer M. Prevalence of seizures in cats after head trauma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2012;241(11):1467-70.
87. Hayes GM. Severe seizures associated with traumatic brain injury managed by controlled hypothermia, pharmacologic coma, and mechanical ventilation in a dog. *Journal of veterinary emergency and critical care*. 2009;19(6):629-34.
88. Platt SR, Radaelli ST, McDonnell JJ. The prognostic value of the modified Glasgow Coma Scale in head trauma in dogs. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2001;15(6):581-4.
89. Landwirtschaft BfEu. Versuchstierzahlen 2013 2014. Available from: http://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Tier/Tierschutz/2013-TierversuchszahlenGesamt.pdf?__blob=publicationFile&jsessionid=B81B74E8CE27C04C69014B93E992315E.2_cid385?__blob=publicationFile.
90. Finnie JW. Comparative approach to understanding traumatic injury in the immature, postnatal brain of domestic animals. *Australian veterinary journal*. 2012;90(8):301-7.
91. Lighthall JW. Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *Journal of neurotrauma*. 1988;5(1):1-15.
92. Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghamai AA, Hayes RL. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *Journal of neuroscience methods*. 1991;39(3):253-62.
93. Smith DH, Soares HD, Pierce JS, Perlman KG, Saatman KE, Meaney DF, et al. A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. *Journal of neurotrauma*. 1995;12(2):169-78.
94. Sebastiani A, Götz C, Werner C, Schafer MK, Engelhard K, Thal SC. Proneurotrophin Binding to P75 Neurotrophin Receptor (P75ntr) Is Essential for Brain Lesion Formation and Functional Impairment after Experimental Traumatic Brain Injury. *Journal of neurotrauma*. 2015.

95. Campos-Pires R, Armstrong SP, Sebastiani A, Luh C, Gruss M, Radyushkin K, et al. Xenon Improves Neurologic Outcome and Reduces Secondary Injury Following Trauma in an In Vivo Model of Traumatic Brain Injury. *Critical care medicine*. 2014.
96. Brody DL, Mac Donald C, Kessens CC, Yuede C, Parsadonian M, Spinner M, et al. Electromagnetic controlled cortical impact device for precise, graded experimental traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*. 2007;24(4):657-73.
97. Alder J, Fujioka W, Lifshitz J, Crockett DP, Thakker-Varia S. Lateral fluid percussion: model of traumatic brain injury in mice. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2011(54).
98. Conti AC, Raghupathi R, Trojanowski JQ, McIntosh TK. Experimental brain injury induces regionally distinct apoptosis during the acute and delayed post-traumatic period. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1998;18(15):5663-72.
99. Hayes RL, Stalhammar D, Povlishock JT, Allen AM, Galinat BJ, Becker DP, et al. A new model of concussive brain injury in the cat produced by extradural fluid volume loading: II. Physiological and neuropathological observations. *Brain injury*. 1987;1(1):93-112.
100. McIntosh TK, Vink R, Noble L, Yamakami I, Fernyak S, Soares H, et al. Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. *Neuroscience*. 1989;28(1):233-44.
101. Carbonell WS, Maris DO, McCall T, Grady MS. Adaptation of the fluid percussion injury model to the mouse. *Journal of neurotrauma*. 1998;15(3):217-29.
102. Sanders MJ, Dietrich WD, Green EJ. Cognitive function following traumatic brain injury: effects of injury severity and recovery period in a parasagittal fluid-percussive injury model. *Journal of neurotrauma*. 1999;16(10):915-25.
103. Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, Murray HM, Dail WG. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain research*. 1981;211(1):67-77.
104. Shapira Y, Shohami E, Sidi A, Soffer D, Freeman S, Cotev S. Experimental closed head injury in rats: mechanical, pathophysiologic, and neurologic properties. *Critical care medicine*. 1988;16(3):258-65.
105. Flierl MA, Stahel PF, Beauchamp KM, Morgan SJ, Smith WR, Shohami E. Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. *Nature protocols*. 2009;4(9):1328-37.
106. Raslan F, Albert-Weissenberger C, Ernestus RI, Kleinschnitz C, Siren AL. Focal brain trauma in the cryogenic lesion model in mice. *Experimental & translational stroke medicine*. 2012;4:6.
107. Eriskat J, Furst M, Stoffel M, Baethmann A. Correlation of lesion volume and brain swelling from a focal brain trauma. *Acta neurochirurgica Supplement*. 2003;86:265-6.
108. Dekker SE, Bambakidis T, Sillesen M, Liu B, Johnson CN, Jin G, et al. Effect of pharmacologic resuscitation on the brain gene expression profiles in a swine model of traumatic brain injury and hemorrhage. *J Trauma Acute Care Surg*. 2014;77(6):906-12; discussion 12.
109. Donat CK, Fischer F, Walter B, Deuther-Conrad W, Brodhun M, Bauer R, et al. Early increase of cannabinoid receptor density after experimental traumatic brain injury in the newborn piglet. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2014;74(2):197-210.
110. Casey-Trott TM, Millman ST, Turner PV, Nykamp SG, Lawlis PC, Widowski TM. Effectiveness of a nonpenetrating captive bolt for euthanasia of 3 kg to 9 kg pigs. *J Anim Sci*. 2014;92(11):5166-74.
111. Finnie IW. Traumatic head injury in ruminant livestock. *Australian veterinary journal*. 1997;75(3):204-8.

112. Finnie JW, Blumbergs PC, Manavis J, Summersides GE, Davies RA. Evaluation of brain damage resulting from penetrating and non-penetrating captive bolt stunning using lambs. *Australian veterinary journal*. 2000;78(11):775-8.
113. Finnie JW, Manavis J, Blumbergs PC, Summersides GE. Brain damage in sheep from penetrating captive bolt stunning. *Australian veterinary journal*. 2002;80(1-2):67-9.
114. Finnie JW, Manavis J, Summersides GE, Blumbergs PC. Brain damage in pigs produced by impact with a non-penetrating captive bolt pistol. *Australian veterinary journal*. 2003;81(3):153-5.
115. Jean A, Nyein MK, Zheng JQ, Moore DF, Joannopoulos JD, Radovitzky R. An animal-to-human scaling law for blast-induced traumatic brain injury risk assessment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(43):15310-5.
116. Roux PP, Barker PA. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Progress in neurobiology*. 2002;67(3):203-33.
117. Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annual review of neuroscience*. 1996;19:289-317.
118. Gotz R, Koster R, Winkler C, Raulf F, Lottspeich F, Scharf M, et al. Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature*. 1994;372(6503):266-9.
119. Nilsson AS, Fainzilber M, Falck P, Ibanez CF. Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS letters*. 1998;424(3):285-90.
120. Lessmann V, Brigadski T. Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. *Neuroscience research*. 2009;65(1):11-22.
121. Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*. 2001;294(5548):1945-8.
122. Lessmann V, Gottmann K, Malsangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Progress in neurobiology*. 2003;69(5):341-74.
123. Carvalho AL, Caldeira MV, Santos SD, Duarte CB. Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses. *British journal of pharmacology*. 2008;153 Suppl 1:S310-24.
124. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual review of neuroscience*. 2001;24:677-736.
125. Kotlyanskaya L, McLinden KA, Giniger E. Of proneurotrophins and their antineurotrophic effects. *Science signaling*. 2013;6(262):pe6.
126. Gong Y, Cao P, Yu HJ, Jiang T. Crystal structure of the neurotrophin-3 and p75NTR symmetrical complex. *Nature*. 2008;454(7205):789-93.
127. He XL, Garcia KC. Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science*. 2004;304(5672):870-5.
128. Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF, Chao MV. High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature*. 1991;350(6320):678-83.
129. Rostami E, Krueger F, Plantman S, Davidsson J, Agoston D, Grafman J, et al. Alteration in BDNF and its receptors, full-length and truncated TrkB and p75(NTR) following penetrating traumatic brain injury. *Brain research*. 2014;1542:195-205.
130. Harrington AW, Leiner B, Blechschmitt C, Arevalo JC, Lee R, Morl K, et al. Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(16):6226-30.
131. Irmady K, Jackman KA, Padow VA, Shahani N, Martin LA, Cerchietti L, et al. Mir-592 regulates the induction and cell death-promoting activity of p75NTR in neuronal ischemic injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2014;34(9):3419-28.

132. Fahnstock M, Michalski B, Xu B, Coughlin MD. The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. *Molecular and cellular neurosciences*. 2001;18(2):210-20.
133. Peng S, Wu J, Mufson EJ, Fahnstock M. Increased proNGF levels in subjects with mild cognitive impairment and mild Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2004;63(6):641-9.
134. Radeke MJ, Misko TP, Hsu C, Herzenberg LA, Shooter EM. Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature*. 1987;325(6105):593-7.
135. Baldwin AN, Bitler CM, Welcher AA, Shooter EM. Studies on the structure and binding properties of the cysteine-rich domain of rat low affinity nerve growth factor receptor (p75NGFR). *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(12):8352-9.
136. Shamovsky IL, Ross GM, Riopelle RJ, Weaver DF. The interaction of neurotrophins with the p75NTR common neurotrophin receptor: a comprehensive molecular modeling study. *Protein Sci*. 1999;8(11):2223-33.
137. Liepinsh E, Ilag LL, Otting G, Ibanez CF. NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *The EMBO journal*. 1997;16(16):4999-5005.
138. Zampieri N, Xu CF, Neubert TA, Chao MV. Cleavage of p75 neurotrophin receptor by alpha-secretase and gamma-secretase requires specific receptor domains. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(15):14563-71.
139. Coulson EJ, Reid K, Baca M, Shipham KA, Hulett SM, Kilpatrick TJ, et al. Chopper, a new death domain of the p75 neurotrophin receptor that mediates rapid neuronal cell death. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(39):30537-45.
140. Lad SP, Neet KE. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway through p75NTR: a common mechanism for the neurotrophin family. *Journal of neuroscience research*. 2003;73(5):614-26.
141. Matusica D, Skeldal S, Sykes AM, Palstra N, Sharma A, Coulson EJ. An intracellular domain fragment of the p75 neurotrophin receptor (p75(NTR)) enhances tropomyosin receptor kinase A (TrkA) receptor function. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(16):11144-54.
142. Naumann T, Casademunt E, Hollerbach E, Hofmann J, Dechant G, Frotscher M, et al. Complete deletion of the neurotrophin receptor p75NTR leads to long-lasting increases in the number of basal forebrain cholinergic neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22(7):2409-18.
143. Zagrebelsky M, Holz A, Dechant G, Barde YA, Bonhoeffer T, Korte M. The p75 neurotrophin receptor negatively modulates dendrite complexity and spine density in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2005;25(43):9989-99.
144. Je HS, Yang F, Ji Y, Nagappan G, Hempstead BL, Lu B. Role of pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) to mature BDNF conversion in activity-dependent competition at developing neuromuscular synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(39):15924-9.
145. Je HS, Yang F, Ji Y, Potluri S, Fu XQ, Luo ZG, et al. ProBDNF and mature BDNF as punishment and reward signals for synapse elimination at mouse neuromuscular junctions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2013;33(24):9957-62.
146. Troy CM, Friedman JE, Friedman WJ. Mechanisms of p75-mediated death of hippocampal neurons. Role of caspases. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(37):34295-302.
147. Ahmad I, Fernando A, Gurgel R, Jason Clark J, Xu L, Hansen MR. Merlin status regulates p75 expression and apoptotic signaling in Schwann cells following nerve injury. *Neurobiology of disease*. 2015;82:114-22.

148. Dubreuil CI, Winton MJ, McKerracher L. Rho activation patterns after spinal cord injury and the role of activated Rho in apoptosis in the central nervous system. *The Journal of cell biology*. 2003;162(2):233-43.
149. Casademunt E, Carter BD, Benzel I, Frade JM, Dechant G, Barde YA. The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75(NTR) and participates in programmed cell death. *The EMBO journal*. 1999;18(21):6050-61.
150. Kenchappa RS, Zampieri N, Chao MV, Barker PA, Teng HK, Hempstead BL, et al. Ligand-dependent cleavage of the P75 neurotrophin receptor is necessary for NRIF nuclear translocation and apoptosis in sympathetic neurons. *Neuron*. 2006;50(2):219-32.
151. Salehi AH, Roux PP, Kubu CJ, Zeindler C, Bhakar A, Tannis LL, et al. NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron*. 2000;27(2):279-88.
152. Mukai J, Hachiya T, Shoji-Hoshino S, Kimura MT, Nadano D, Suvanto P, et al. NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(23):17566-70.
153. Park JA, Lee JY, Sato TA, Koh JY. Co-induction of p75NTR and p75NTR-associated death executor in neurons after zinc exposure in cortical culture or transient ischemia in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000;20(24):9096-103.
154. Kimura MT, Irie S, Shoji-Hoshino S, Mukai J, Nadano D, Oshimura M, et al. 14-3-3 is involved in p75 neurotrophin receptor-mediated signal transduction. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(20):17291-300.
155. Wehrman T, He X, Raab B, Dukipatti A, Blau H, Garcia KC. Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. *Neuron*. 2007;53(1):25-38.
156. Khursigara G, Bertin J, Yano H, Moffett H, DiStefano PS, Chao MV. A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001;21(16):5854-63.
157. Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annual review of biochemistry*. 2003;72:609-42.
158. Klein R, Jing SQ, Nanduri V, O'Rourke E, Barbacid M. The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell*. 1991;65(1):189-97.
159. Bibel M, Hoppe E, Barde YA. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *The EMBO journal*. 1999;18(3):616-22.
160. Lamballe F, Klein R, Barbacid M. trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell*. 1991;66(5):967-79.
161. Segal RA, Greenberg ME. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annual review of neuroscience*. 1996;19:463-89.
162. Snider WD. Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell*. 1994;77(5):627-38.
163. Miller FD, Kaplan DR. Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2001;58(8):1045-53.
164. Hermey G. The Vps10p-domain receptor family. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2009;66(16):2677-89.
165. Quistgaard EM, Madsen P, Groftehaug MK, Nissen P, Petersen CM, Thirup SS. Ligands bind to Sortilin in the tunnel of a ten-bladed beta-propeller domain. *Nature structural & molecular biology*. 2009;16(1):96-8.
166. Petersen CM, Nielsen MS, Nykjaer A, Jacobsen L, Tommerup N, Rasmussen HH, et al. Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain

- by receptor-associated protein affinity chromatography. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(6):3599-605.
167. Nykjaer A, Willnow TE. Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends in neurosciences*. 2012;35(4):261-70.
168. Munck Petersen C, Nielsen MS, Jacobsen C, Tauris J, Jacobsen L, Gliemann J, et al. Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *The EMBO journal*. 1999;18(3):595-604.
169. Willnow TE, Petersen CM, Nykjaer A. VPS10P-domain receptors - regulators of neuronal viability and function. *Nature reviews Neuroscience*. 2008;9(12):899-909.
170. Sarret P, Krzywkowski P, Segal L, Nielsen MS, Petersen CM, Mazella J, et al. Distribution of NTS3 receptor/sortilin mRNA and protein in the rat central nervous system. *The Journal of comparative neurology*. 2003;461(4):483-505.
171. Kjolby M, Andersen OM, Breiderhoff T, Fjorback AW, Pedersen KM, Madsen P, et al. Sort1, encoded by the cardiovascular risk locus 1p13.3, is a regulator of hepatic lipoprotein export. *Cell metabolism*. 2010;12(3):213-23.
172. Nakamura K, Namekata K, Harada C, Harada T. Intracellular sortilin expression pattern regulates proNGF-induced naturally occurring cell death during development. *Cell death and differentiation*. 2007;14(8):1552-4.
173. Chen LW, Yung KK, Chan YS, Shum DK, Bolam JP. The proNGF-p75NTR-sortilin signalling complex as new target for the therapeutic treatment of Parkinson's disease. *CNS & neurological disorders drug targets*. 2008;7(6):512-23.
174. Stoica G, Lungu G, Kim HT, Wong PK. Up-regulation of pro-nerve growth factor, neurotrophin receptor p75, and sortilin is associated with retrovirus-induced spongiform encephalomyelopathy. *Brain research*. 2008;1208:204-16.
175. Tauris J, Gustafsen C, Christensen EI, Jansen P, Nykjaer A, Nyengaard JR, et al. Proneurotrophin-3 may induce Sortilin-dependent death in inner ear neurons. *The European journal of neuroscience*. 2011;33(4):622-31.
176. Al-Shawi R, Hafner A, Olsen J, Chun S, Raza S, Thrasivoulou C, et al. Neurotoxic and neurotrophic roles of proNGF and the receptor sortilin in the adult and ageing nervous system. *The European journal of neuroscience*. 2008;27(8):2103-14.
177. Terry AV, Jr., Kutiyawalla A, Pillai A. Age-dependent alterations in nerve growth factor (NGF)-related proteins, sortilin, and learning and memory in rats. *Physiology & behavior*. 2011;102(2):149-57.
178. Carlo AS, Nykjaer A, Willnow TE. Sorting receptor sortilin-a culprit in cardiovascular and neurological diseases. *Journal of molecular medicine*. 2014;92(9):905-11.
179. Chu GK, Yu W, Fehlings MG. The p75 neurotrophin receptor is essential for neuronal cell survival and improvement of functional recovery after spinal cord injury. *Neuroscience*. 2007;148(3):668-82.
180. Angelo MF, Aviles-Reyes RX, Villarreal A, Barker P, Reines AG, Ramos AJ. p75 NTR expression is induced in isolated neurons of the penumbra after ischemia by cortical devascularization. *Journal of neuroscience research*. 2009;87(8):1892-903.
181. Bushuven S, Heise D. Propofol up2date – Teil 1: Geschichte und pharmakologische Charakteristika. *AINS - Anästhesiologie · Intensivmedizin · Notfallmedizin · Schmerztherapie*. 2013.
182. Adembri C, Venturi L, Pellegrini-Giampietro DE. Neuroprotective effects of propofol in acute cerebral injury. *CNS drug reviews*. 2007;13(3):333-51.
183. Jurd R, Arras M, Lambert S, Drexler B, Siegwart R, Crestani F, et al. General anesthetic actions in vivo strongly attenuated by a point mutation in the GABA(A) receptor beta3 subunit. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17(2):250-2.

184. Kotani Y, Nakajima Y, Hasegawa T, Satoh M, Nagase H, Shimazawa M, et al. Propofol exerts greater neuroprotection with disodium edetate than without it. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2008;28(2):354-66.
185. Kotani Y, Shimazawa M, Yoshimura S, Iwama T, Hara H. The experimental and clinical pharmacology of propofol, an anesthetic agent with neuroprotective properties. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2008;14(2):95-106.
186. Löscher W, Ungemach Fr, Kroker R. *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*. 8. Auflage ed: Enke; 2010.
187. Muir WW, 3rd, Gadawski JE. Respiratory depression and apnea induced by propofol in dogs. *Am J Vet Res*. 1998;59(2):157-61.
188. Soltesz S, Silomon M, Graf G, Mencke T, Boulaadass S, Molter GP. Effect of a 0.5% dilution of propofol on pain on injection during induction of anesthesia in children. *Anesthesiology*. 2007;106(1):80-4.
189. Weaver BM, Raptopoulos D. Induction of anaesthesia in dogs and cats with propofol. *Vet Rec*. 1990;126(25):617-20.
190. Wu J, Mahmoud M, Schmitt M, Hossain M, Kurth D. Comparison of propofol and dexmedetomidine techniques in children undergoing magnetic resonance imaging. *Paediatr Anaesth*. 2014;24(8):813-8.
191. Scheier E, Gadot C, Leiba R, Shavit I. Sedation with the Combination of Ketamine and Propofol in a Pediatric ED: A Retrospective Case Series Analysis. *Am J Emerg Med*. 2015;33(6):815-7.
192. Ronan KP, Gallagher TJ, George B, Hamby B. Comparison of propofol and midazolam for sedation in intensive care unit patients. *Critical care medicine*. 1995;23(2):286-93.
193. Flower O, Hellings S. Sedation in traumatic brain injury. *Emerg Med Int*. 2012;2012:637171.
194. Wappler F. Das Propofol-Infusionssyndrom: Klinik, Pathophysiologie und Therapie einer seltenen Komplikation. *Deutsches Ärzteblatt*. 2006;103(11):A 705-10.
195. Diaz JH, Prabhakar A, Urman RD, Kaye AD. Propofol infusion syndrome: a retrospective analysis at a level 1 trauma center. *Crit Care Res Pract*. 2014;2014:346968.
196. Pothineni NV, Hayes K, Deshmukh A, Paydak H. Propofol-related infusion syndrome: rare and fatal. *Am J Ther*. 2015;22(2):e33-5.
197. Verordnung über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, (2009).
198. Verordnung zur Erstellung eines Verzeichnisses von für die Behandlung von Equiden wesentlichen Stoffen gemäß der Richtlinie 2001/82/EG des Europäischen Parlaments und des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Tierarzneimittel, (2006).
199. Mathis A, Pinelas R, Brodbelt DC, Alibhai HI. Comparison of quality of recovery from anaesthesia in cats induced with propofol or alfaxalone. *Vet Anaesth Analg*. 2012;39(3):282-90.
200. Kennedy MJ, Smith LJ. A comparison of cardiopulmonary function, recovery quality, and total dosages required for induction and total intravenous anesthesia with propofol versus a propofol-ketamine combination in healthy Beagle dogs. *Vet Anaesth Analg*. 2014.
201. Martinez-Taboada F, Leece EA. Comparison of propofol with ketofol, a propofol-ketamine admixture, for induction of anaesthesia in healthy dogs. *Vet Anaesth Analg*. 2014;41(6):575-82.
202. Ravasio G, Gallo M, Beccaglia M, Comazzi S, Gelain ME, Fonda D, et al. Evaluation of a ketamine-propofol drug combination with or without dexmedetomidine for intravenous anesthesia in cats undergoing ovariectomy. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2012;241(10):1307-13.

203. Short CE, Bufalari A. Propofol anesthesia. The Veterinary clinics of North America Small animal practice. 1999;29(3):747-78.
204. Caines D, Sinclair M, Valverde A, Dyson D, Gaitero L, Wood D. Comparison of isoflurane and propofol for maintenance of anesthesia in dogs with intracranial disease undergoing magnetic resonance imaging. Vet Anaesth Analg. 2014;41(5):468-79.
205. Posner LP, Kasten JI, Kata C. Propofol with ketamine following sedation with xylazine for routine induction of general anaesthesia in horses. Vet Rec. 2013;173(22):550.
206. Rezende ML, Boscan P, Stanley SD, Mama KR, Steffey EP. Evaluation of cardiovascular, respiratory and biochemical effects, and anesthetic induction and recovery behavior in horses anesthetized with a 5% micellar microemulsion propofol formulation. Vet Anaesth Analg. 2010;37(5):440-50.
207. Boothe DM. Drug therapy in cats: mechanisms and avoidance of adverse drug reactions. Journal of the American Veterinary Medical Association. 1990;196(8):1297-305.
208. Andress JL, Day TK, Day D. The effects of consecutive day propofol anesthesia on feline red blood cells. Vet Surg. 1995;24(3):277-82.
209. Wilson JX, Gelb AW. Free radicals, antioxidants, and neurologic injury: possible relationship to cerebral protection by anesthetics. J Neurosurg Anesthesiol. 2002;14(1):66-79.
210. Ding Z, Zhang J, Xu J, Sheng G, Huang G. Propofol administration modulates AQP-4 expression and brain edema after traumatic brain injury. Cell Biochem Biophys. 2013;67(2):615-22.
211. Koch C, Reid RC. Neuroscience: Observatories of the mind. Nature. 2012;483(7390):397-8.
212. Engelhard K, Werner C, Eberspacher E, Pape M, Stegemann U, Kellermann K, et al. Influence of propofol on neuronal damage and apoptotic factors after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats: a long-term observation. Anesthesiology. 2004;101(4):912-7.
213. Rossaint J, Rossaint R, Weis J, Fries M, Rex S, Coburn M. Propofol: neuroprotection in an in vitro model of traumatic brain injury. Critical care (London, England). 2009;13(2):R61.
214. De Riu PL, Petruzzi V, Testa C, Mulas M, Melis F, Caria MA, et al. Propofol anticonvulsant activity in experimental epileptic status. British journal of anaesthesia. 1992;69(2):177-81.
215. Costa D, Leiva M, Moll X, Aguilar A, Pena T, Andaluz A. Alfaxalone versus propofol in dogs: a randomised trial to assess effects on peri-induction tear production, intraocular pressure and globe position. Vet Rec. 2015;176(3):73.
216. Gommeren K, Claeys S, de Rooster H, Hamaide A, Daminet S. Outcome from status epilepticus after portosystemic shunt attenuation in 3 dogs treated with propofol and phenobarbital. Journal of veterinary emergency and critical care. 2010;20(3):346-51.
217. Steffen F, Grasmueck S. Propofol for treatment of refractory seizures in dogs and a cat with intracranial disorders. J Small Anim Pract. 2000;41(11):496-9.
218. Karen T, Schlager GW, Bendix I, Sifringer M, Herrmann R, Pantazis C, et al. Effect of propofol in the immature rat brain on short- and long-term neurodevelopmental outcome. PloS one. 2013;8(5):e64480.
219. Fredriksson A, Ponten E, Gordh T, Eriksson P. Neonatal exposure to a combination of N-methyl-D-aspartate and gamma-aminobutyric acid type A receptor anesthetic agents potentiates apoptotic neurodegeneration and persistent behavioral deficits. Anesthesiology. 2007;107(3):427-36.
220. Honegger P, Matthieu JM. Selective toxicity of the general anesthetic propofol for GABAergic neurons in rat brain cell cultures. Journal of neuroscience research. 1996;45(5):631-6.

221. Xiong M, Li J, Alhashem HM, Tilak V, Patel A, Pisklakov S, et al. Propofol exposure in pregnant rats induces neurotoxicity and persistent learning deficit in the offspring. *Brain Sci.* 2014;4(2):356-75.
222. Al-Jahdari WS, Saito S, Nakano T, Goto F. Propofol induces growth cone collapse and neurite retractions in chick explant culture. *Can J Anaesth.* 2006;53(11):1078-85.
223. Head BP, Patel HH, Niesman IR, Drummond JC, Roth DM, Patel PM. Inhibition of p75 neurotrophin receptor attenuates isoflurane-mediated neuronal apoptosis in the neonatal central nervous system. *Anesthesiology.* 2009;110(4):813-25.
224. Cattai A, Rabozzi R, Natale V, Franci P. The incidence of spontaneous movements (myoclonus) in dogs undergoing total intravenous anaesthesia with propofol. *Vet Anaesth Analg.* 2015;42(1):93-8.
225. Smedile LE, Duke T, Taylor SM. Excitatory movements in a dog following propofol anesthesia. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1996;32(4):365-8.
226. TSchG - Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 3 des Gesetzes vom 28. Juli 2014 (BGBl. I S. 1308) geändert worden ist.
227. Lee KF, Li E, Huber LJ, Landis SC, Sharpe AH, Chao MV, et al. Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system. *Cell.* 1992;69(5):737-49.
228. von Schack D, Casademunt E, Schweigreiter R, Meyer M, Bibel M, Dechant G. Complete ablation of the neurotrophin receptor p75NTR causes defects both in the nervous and the vascular system. *Nature neuroscience.* 2001;4(10):977-8.
229. Mahler Convenor M, Berard M, Feinstein R, Gallagher A, Illgen-Wilcke B, Pritchett-Corning K, et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory animals.* 2014;48(3):178-92.
230. TSchVersV - Tierschutz-Versuchstierverordnung vom 1. August 2013 (BGBl. I S. 3125, 3126), die durch Artikel 6 der Verordnung vom 12. Dezember 2013 (BGBl. I S. 4145) geändert worden ist.
231. ETS No.123 Appendix A - Appendix A of the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes, Strasbourg, 15 Juni 2006.
232. Bernsmann E, Dietrich H, Weiß J, Chourbaji S. Versuchstierkunde: Tierpflege in Forschung und Klinik. 1. Auflage ed: Enke; 2014.
233. Olsson IA, Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of "environmental enrichment". *Laboratory animals.* 2002;36(3):243-70.
234. Smith AL, Corrow DJ. Modifications to husbandry and housing conditions of laboratory rodents for improved well-being. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources.* 2005;46(2):140-7.
235. GV SOLAS Tiergerechte Haltung: Labormäuse.
236. Onyszchuk G, Al-Hafez B, He YY, Bilgen M, Berman NE, Brooks WM. A mouse model of sensorimotor controlled cortical impact: characterization using longitudinal magnetic resonance imaging, behavioral assessments and histology. *Journal of neuroscience methods.* 2007;160(2):187-96.
237. Deitch AD, Moses MJ. The Nissl substance of living and fixed spinal ganglion cells. II. An ultraviolet absorption study. *The Journal of biophysical and biochemical cytology.* 1957;3(3):449-56.
238. Shohami E, Novikov M, Bass R. Long-term effect of HU-211, a novel non-competitive NMDA antagonist, on motor and memory functions after closed head injury in the rat. *Brain research.* 1995;674(1):55-62.

239. Jones BJ, Roberts DJ. The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1968;20(4):302-4.
240. Hamm RJ, Pike BR, O'Dell DM, Lyeth BG, Jenkins LW. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*. 1994;11(2):187-96.
241. Hall KE, Holowaychuk MK, Sharp CR, Reineke E. Multicenter prospective evaluation of dogs with trauma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2014;244(3):300-8.
242. Clancy, S. (2008) RNA splicing: introns, exons and spliceosome. *Nature Education* 1(1):31.
243. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. Duale Reihe: Biochemie. Erstausgabe ed: Thieme Verlag 2006.
244. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques*. 1998;24(6):954-8, 60, 62.
245. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques*. 1997;22(1):130-1, 4-8.
246. Thal SC, Wyschkon S, Pieter D, Engelhard K, Werner C. Selection of endogenous control genes for normalization of gene expression analysis after experimental brain trauma in mice. *Journal of neurotrauma*. 2008;25(7):785-94.
247. Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76(7):3116-20.
248. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76(9):4350-4.
249. Thomas JM, Hodes ME. A new discontinuous buffer system for the electrophoresis of cationic proteins at near-neutral pH. *Analytical biochemistry*. 1981;118(1):194-6.
250. Siman R, Noszek JC, Kegerise C. Calpain I activation is specifically related to excitatory amino acid induction of hippocampal damage. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1989;9(5):1579-90.
251. Yang J, Siao CJ, Nagappan G, Marinic T, Jing D, McGrath K, et al. Neuronal release of proBDNF. *Nature neuroscience*. 2009;12(2):113-5.
252. Beattie MS, Hermann GE, Rogers RC, Bresnahan JC. Cell death in models of spinal cord injury. *Prog Brain Res*. 2002;137:37-47.
253. Provenzano MJ, Xu N, Ver Meer MR, Clark JJ, Hansen MR. p75NTR and sortilin increase after facial nerve injury. *The Laryngoscope*. 2008;118(1):87-93.
254. Yano H, Torkin R, Martin LA, Chao MV, Teng KK. Proneurotrophin-3 is a neuronal apoptotic ligand: evidence for retrograde-directed cell killing. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(47):14790-802.
255. Chen CY, Ezzeddine N, Shyu AB. Messenger RNA half-life measurements in mammalian cells. *Methods Enzymol*. 2008;448:335-57.
256. Kiss M, Dallos A, Kormos B, Santha P, Dobozy A, Husz S, et al. Sortilin is expressed in cultured human keratinocytes and is regulated by cutaneous neuropeptides. *J Invest Dermatol*. 2010;130(11):2553-60.
257. Villa PG, Henzel WJ, Sensenbrenner M, Henderson CE, Pettmann B. Calpain inhibitors, but not caspase inhibitors, prevent actin proteolysis and DNA fragmentation during apoptosis. *Journal of cell science*. 1998;111 (Pt 6):713-22.

258. Wang KK. Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends in neurosciences*. 2000;23(1):20-6.
259. Dhanoa NK, Krol KM, Jahed A, Crutcher KA, Kawaja MD. Null mutations for exon III and exon IV of the p75 neurotrophin receptor gene enhance sympathetic sprouting in response to elevated levels of nerve growth factor in transgenic mice. *Experimental neurology*. 2006;198(2):416-26.
260. Paul CE, Vereker E, Dickson KM, Barker PA. A pro-apoptotic fragment of the p75 neurotrophin receptor is expressed in p75NTR^{ExonIV} null mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(8):1917-23.
261. Hutson LD, Bothwell M. Expression and function of *Xenopus laevis* p75(NTR) suggest evolution of developmental regulatory mechanisms. *Journal of neurobiology*. 2001;49(2):79-98.
262. Frade JM, Rodriguez-Tebar A, Barde YA. Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature*. 1996;383(6596):166-8.
263. Sakuragi S, Tominaga-Yoshino K, Ogura A. Involvement of TrkB- and p75(NTR)-signaling pathways in two contrasting forms of long-lasting synaptic plasticity. *Scientific reports*. 2013;3:3185.
264. VonDran MW, LaFrancois J, Padow VA, Friedman WJ, Scharfman HE, Milner TA, et al. p75NTR, but Not proNGF, Is Upregulated Following Status Epilepticus in Mice. *ASN neuro*. 2014;6(5).
265. Mufson EJ, Ginsberg SD, Ikonomic MD, DeKosky ST. Human cholinergic basal forebrain: chemoanatomy and neurologic dysfunction. *Journal of chemical neuroanatomy*. 2003;26(4):233-42.
266. Lebrun-Julien F, Bertrand MJ, De Backer O, Stellwagen D, Morales CR, Di Polo A, et al. ProNGF induces TNF α -dependent death of retinal ganglion cells through a p75NTR non-cell-autonomous signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(8):3817-22.
267. Griesmaier E, Schlager G, Wegleiter K, Hermann M, Urbanek M, Simbruner G, et al. Role of p75NTR in NMDAR-mediated excitotoxic brain injury in neonatal mice. *Brain research*. 2010;1355:31-40.
268. Boyd JG, Gordon T. The neurotrophin receptors, trkB and p75, differentially regulate motor axonal regeneration. *Journal of neurobiology*. 2001;49(4):314-25.
269. Timaru-Kast R, Luh C, Gotthardt P, Huang C, Schafer MK, Engelhard K, et al. Influence of age on brain edema formation, secondary brain damage and inflammatory response after brain trauma in mice. *PloS one*. 2012;7(8):e43829.
270. Tsenter J, Beni-Adani L, Assaf Y, Alexandrovich AG, Trembovler V, Shohami E. Dynamic changes in the recovery after traumatic brain injury in mice: effect of injury severity on T2-weighted MRI abnormalities, and motor and cognitive functions. *Journal of neurotrauma*. 2008;25(4):324-33.
271. Beni-Adani L, Gozes I, Cohen Y, Assaf Y, Steingart RA, Brenneman DE, et al. A peptide derived from activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) ameliorates injury response in closed head injury in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2001;296(1):57-63.
272. Turner BJ, Cheah IK, Macfarlane KJ, Lopes EC, Petratos S, Langford SJ, et al. Antisense peptide nucleic acid-mediated knockdown of the p75 neurotrophin receptor delays motor neuron disease in mutant SOD1 transgenic mice. *Journal of neurochemistry*. 2003;87(3):752-63.
273. Tep C, Lim TH, Ko PO, Getahun S, Ryu JC, Goettl VM, et al. Oral administration of a small molecule targeted to block proNGF binding to p75 promotes myelin sparing and functional recovery after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2013;33(2):397-410.

274. Yamada KH, Kozlowski DA, Seidl SE, Lance S, Wieschhaus AJ, Sundivakkam P, et al. Targeted gene inactivation of calpain-1 suppresses cortical degeneration due to traumatic brain injury and neuronal apoptosis induced by oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(16):13182-93.
275. Rami A, Agarwal R, Botez G, Winckler J. μ -Calpain activation, DNA fragmentation, and synergistic effects of caspase and calpain inhibitors in protecting hippocampal neurons from ischemic damage. *Brain research*. 2000;866(1-2):299-312.
276. Lee YB, Du S, Rhim H, Lee EB, Markelonis GJ, Oh TH. Rapid increase in immunoreactivity to GFAP in astrocytes in vitro induced by acidic pH is mediated by calcium influx and calpain I. *Brain research*. 2000;864(2):220-9.
277. Yang T, Knowles JK, Lu Q, Zhang H, Arancio O, Moore LA, et al. Small molecule, non-peptide p75 ligands inhibit Abeta-induced neurodegeneration and synaptic impairment. *PloS one*. 2008;3(11):e3604.
278. Rami A. Ischemic neuronal death in the rat hippocampus: the calpain-calpastatin-caspase hypothesis. *Neurobiology of disease*. 2003;13(2):75-88.
279. Mondello S, Robicsek SA, Gabrielli A, Brophy GM, Papa L, Tepas J, et al. α II-spectrin breakdown products (SBDPs): diagnosis and outcome in severe traumatic brain injury patients. *Journal of neurotrauma*. 2010;27(7):1203-13.
280. Yan XX, Jeromin A, Jeromin A. Spectrin Breakdown Products (SBDPs) as Potential Biomarkers for Neurodegenerative Diseases. *Current translational geriatrics and experimental gerontology reports*. 2012;1(2):85-93.
281. Natale JE, Ahmed F, Cernak I, Stoica B, Faden AI. Gene expression profile changes are commonly modulated across models and species after traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*. 2003;20(10):907-27.
282. Clausen F, Hanell A, Bjork M, Hillered L, Mir AK, Gram H, et al. Neutralization of interleukin-1 β modifies the inflammatory response and improves histological and cognitive outcome following traumatic brain injury in mice. *The European journal of neuroscience*. 2009;30(3):385-96.
283. Beck KD, Nguyen HX, Galvan MD, Salazar DL, Woodruff TM, Anderson AJ. Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment. *Brain : a journal of neurology*. 2010;133(Pt 2):433-47.
284. Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Otto VI, Stahel PF, Kossmann T. Role of cerebral inflammation after traumatic brain injury: a revisited concept. *Shock (Augusta, Ga)*. 2001;16(3):165-77.
285. Ahn MJ, Sherwood ER, Prough DS, Lin CY, DeWitt DS. The effects of traumatic brain injury on cerebral blood flow and brain tissue nitric oxide levels and cytokine expression. *Journal of neurotrauma*. 2004;21(10):1431-42.
286. Frugier T, Morganti-Kossmann MC, O'Reilly D, McLean CA. In situ detection of inflammatory mediators in post mortem human brain tissue after traumatic injury. *Journal of neurotrauma*. 2010;27(3):497-507.
287. Lu KT, Wang YW, Yang JT, Yang YL, Chen HI. Effect of interleukin-1 on traumatic brain injury-induced damage to hippocampal neurons. *Journal of neurotrauma*. 2005;22(8):885-95.
288. Nguyen TV, Shen L, Vander Griend L, Quach LN, Belichenko NP, Saw N, et al. Small molecule p75^{NTR} ligands reduce pathological phosphorylation and misfolding of tau, inflammatory changes, cholinergic degeneration, and cognitive deficits in AbetaPP(L/S) transgenic mice. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2014;42(2):459-83.

289. Mysona BA, Al-Gayyar MM, Matragoon S, Abdelsaid MA, El-Azab MF, Saragovi HU, et al. Modulation of p75(NTR) prevents diabetes- and proNGF-induced retinal inflammation and blood-retina barrier breakdown in mice and rats. *Diabetologia*. 2013;56(10):2329-39.
290. Pleines UE, Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Joller H, Trentz O, Kossmann T. S-100 beta reflects the extent of injury and outcome, whereas neuronal specific enolase is a better indicator of neuroinflammation in patients with severe traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*. 2001;18(5):491-8.
291. Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Wikkelsø C, Jensen C, Ekholm S, et al. Early intrathecal production of interleukin-6 predicts the size of brain lesion in stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1995;26(8):1393-8.
292. Capsoni S, Tiveron C, Vignone D, Amato G, Cattaneo A. Dissecting the involvement of tropomyosin-related kinase A and p75 neurotrophin receptor signaling in NGF deficit-induced neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(27):12299-304.
293. Clewes O, Fahey MS, Tyler SJ, Watson JJ, Seok H, Catania C, et al. Human ProNGF: biological effects and binding profiles at TrkA, P75NTR and sortilin. *Journal of neurochemistry*. 2008;107(4):1124-35.
294. Koshimizu H, Hazama S, Hara T, Ogura A, Kojima M. Distinct signaling pathways of precursor BDNF and mature BDNF in cultured cerebellar granule neurons. *Neuroscience letters*. 2010;473(3):229-32.
295. Unsain N, Nunez N, Anastasia A, Masco DH. Status epilepticus induces a TrkB to p75 neurotrophin receptor switch and increases brain-derived neurotrophic factor interaction with p75 neurotrophin receptor: an initial event in neuronal injury induction. *Neuroscience*. 2008;154(3):978-93.
296. Majdan M, Walsh GS, Aloyz R, Miller FD. TrkA mediates developmental sympathetic neuron survival in vivo by silencing an ongoing p75NTR-mediated death signal. *The Journal of cell biology*. 2001;155(7):1275-85.
297. Masoudi R, Ioannou MS, Coughlin MD, Pagadala P, Neet KE, Clewes O, et al. Biological activity of nerve growth factor precursor is dependent upon relative levels of its receptors. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(27):18424-33.
298. Della-Bianca V, Rossi F, Armato U, Dal-Pra I, Costantini C, Perini G, et al. Neurotrophin p75 receptor is involved in neuronal damage by prion peptide-(106-126). *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(42):38929-33.
299. Bai Y, Li Q, Yang J, Zhou X, Yin X, Zhao D. p75(NTR) activation of NF-kappaB is involved in PrP106-126-induced apoptosis in mouse neuroblastoma cells. *Neuroscience research*. 2008;62(1):9-14.
300. Tuffereau C, Benejean J, Blondel D, Kieffer B, Flamand A. Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *The EMBO journal*. 1998;17(24):7250-9.
301. Tuffereau C, Schmidt K, Langevin C, Lafay F, Dechant G, Koltzenburg M. The rabies virus glycoprotein receptor p75NTR is not essential for rabies virus infection. *Journal of virology*. 2007;81(24):13622-30.
302. Morganti-Kossmann MC, Yan E, Bye N. Animal models of traumatic brain injury: is there an optimal model to reproduce human brain injury in the laboratory? *Injury*. 2010;41 Suppl 1:S10-3.
303. Marklund N, Hillered L. Animal modelling of traumatic brain injury in preclinical drug development: where do we go from here? *British journal of pharmacology*. 2011;164(4):1207-29.
304. Panzer MB, Wood GW, Bass CR. Scaling in neurotrauma: how do we apply animal experiments to people? *Experimental neurology*. 2014;261:120-6.

305. Ismail M, Henklein P, Huang X, Braumann C, Ruckert RI, Dubiel W. Identification of HIV-1 Tat peptides for future therapeutic angiogenesis. *European journal of haematology*. 2006;77(2):157-65.
306. Yoon JS, Jung YT, Hong SK, Kim SH, Shin MC, Lee DG, et al. Characteristics of HIV-Tat protein transduction domain. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*. 2004;42(4):328-35.
307. Jones SW, Christison R, Bundell K, Voyce CJ, Brockbank SM, Newham P, et al. Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery. *British journal of pharmacology*. 2005;145(8):1093-102.
308. Cheema SS, Barrett GL, Bartlett PF. Reducing p75 nerve growth factor receptor levels using antisense oligonucleotides prevents the loss of axotomized sensory neurons in the dorsal root ganglia of newborn rats. *Journal of neuroscience research*. 1996;46(2):239-45.
309. Gehler S, Gallo G, Veien E, Letourneau PC. p75 neurotrophin receptor signaling regulates growth cone filopodial dynamics through modulating RhoA activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(18):4363-72.
310. Sun Y, Lim Y, Li F, Liu S, Lu JJ, Haberberger R, et al. ProBDNF collapses neurite outgrowth of primary neurons by activating RhoA. *PloS one*. 2012;7(4):e35883.
311. Wei X, Miou Z, Baudry M. Neuroprotection by cell permeable TAT-mGluR1 peptide in ischemia: synergy between carrier and cargo sequences. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2008;14(5):409-14.
312. Dietz GP, Kilic E, Bahr M. Inhibition of neuronal apoptosis in vitro and in vivo using TAT-mediated protein transduction. *Molecular and cellular neurosciences*. 2002;21(1):29-37.
313. Kilic E, Dietz GP, Hermann DM, Bahr M. Intravenous TAT-Bcl-XL is protective after middle cerebral artery occlusion in mice. *Annals of neurology*. 2002;52(5):617-22.
314. Kilic U, Kilic E, Dietz GP, Bahr M. Intravenous TAT-GDNF is protective after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2003;34(5):1304-10.
315. Chauhan A, Tikoo A, Kapur AK, Singh M. The taming of the cell penetrating domain of the HIV Tat: myths and realities. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2007;117(2):148-62.
316. Massa SM, Xie Y, Yang T, Harrington AW, Kim ML, Yoon SO, et al. Small, nonpeptide p75NTR ligands induce survival signaling and inhibit proNGF-induced death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(20):5288-300.
317. Shi J, Longo FM, Massa SM. A small molecule p75(NTR) ligand protects neurogenesis after traumatic brain injury. *Stem cells*. 2013;31(11):2561-74.
318. Grabenstatter HL, Carlsen J, Raol YH, Yang T, Hund D, Cruz Del Angel Y, et al. Acute administration of the small-molecule p75(NTR) ligand does not prevent hippocampal neuron loss or development of spontaneous seizures after pilocarpine-induced status epilepticus. *Journal of neuroscience research*. 2014;92(10):1307-18.
319. Simmons DA, Knowles JK, Belichenko NP, Banerjee G, Finkle C, Massa SM, et al. A small molecule p75NTR ligand, LM11A-31, reverses cholinergic neurite dystrophy in Alzheimer's disease mouse models with mid- to late-stage disease progression. *PloS one*. 2014;9(8):e102136.
320. Knowles JK, Simmons DA, Nguyen TV, Vander Griend L, Xie Y, Zhang H, et al. Small molecule p75NTR ligand prevents cognitive deficits and neurite degeneration in an Alzheimer's mouse model. *Neurobiology of aging*. 2013;34(8):2052-63.
321. Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Xie Y, Beckman JS, Massa SM, et al. Modulation of p75-dependent motor neuron death by a small non-peptidyl mimetic of the neurotrophin loop 1 domain. *The European journal of neuroscience*. 2006;24(6):1575-80.
322. Yamashita T, Tohyama M. The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nature neuroscience*. 2003;6(5):461-7.

323. Yu Y, Jian MY, Wang YZ, Han RQ. Propofol ameliorates calpain-induced collapsin response mediator protein-2 proteolysis in traumatic brain injury in rats. *Chinese medical journal*. 2015;128(7):919-27.
324. Milanovic D, Popic J, Pesic V, Loncarevic-Vasiljkovic N, Kanazir S, Jevtovic-Todorovic V, et al. Regional and temporal profiles of calpain and caspase-3 activities in postnatal rat brain following repeated propofol administration. *Developmental neuroscience*. 2010;32(4):288-301.
325. Chen G, Fu Q, Cao J, Mi W. Effect of propofol on brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B in the hippocampus of aged rats with chronic cerebral ischemia. *Neural Regen Res*. 2012;7(21):1645-9.
326. Milanovic D, Pesic V, Popic J, Tanic N, Kanazir S, Jevtovic-Todorovic V, et al. Propofol anesthesia induces proapoptotic tumor necrosis factor-alpha and pro-nerve growth factor signaling and prosurvival Akt and XIAP expression in neonatal rat brain. *Journal of neuroscience research*. 2014;92(10):1362-73.
327. Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, Benshoff ND, Dikranian K, Zorumski CF, et al. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003;23(3):876-82.
328. Lei X, Guo Q, Zhang J. Mechanistic insights into neurotoxicity induced by anesthetics in the developing brain. *International journal of molecular sciences*. 2012;13(6):6772-99.
329. Yu D, Jiang Y, Gao J, Liu B, Chen P. Repeated exposure to propofol potentiates neuroapoptosis and long-term behavioral deficits in neonatal rats. *Neuroscience letters*. 2013;534:41-6.
330. Stratmann G, Sall JW, Bell JS, Alvi RS, May L, Ku B, et al. Isoflurane does not affect brain cell death, hippocampal neurogenesis, or long-term neurocognitive outcome in aged rats. *Anesthesiology*. 2010;112(2):305-15.
331. Kelly DF, Goodale DB, Williams J, Herr DL, Chappell ET, Rosner MJ, et al. Propofol in the treatment of moderate and severe head injury: a randomized, prospective double-blinded pilot trial. *Journal of neurosurgery*. 1999;90(6):1042-52.
332. Guo P, Huang Z, Tao T, Chen X, Zhang W, Zhang Y, et al. Zebrafish as a model for studying the developmental neurotoxicity of propofol. *Journal of applied toxicology : JAT*. 2015.
333. Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, et al. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2005;25(22):5455-63.
334. Hermans-Borgmeyer I, Hermey G, Nykjaer A, Schaller C. Expression of the 100-kDa neurotensin receptor sortilin during mouse embryonal development. *Brain research Molecular brain research*. 1999;65(2):216-9.
335. Saadipour K, Yang M, Lim Y, Georgiou K, Sun Y, Keating D, et al. Amyloid beta(1-)(-)(4)(2) (A β (4)(2)) up-regulates the expression of sortilin via the p75(NTR)/RhoA signaling pathway. *Journal of neurochemistry*. 2013;127(2):152-62.
336. Wei Y, Wang N, Lu Q, Zhang N, Zheng D, Li J. Enhanced protein expressions of sortilin and p75NTR in retina of rat following elevated intraocular pressure-induced retinal ischemia. *Neuroscience letters*. 2007;429(2-3):169-74.
337. Arnett MG, Ryals JM, Wright DE. Pro-NGF, sortilin, and p75NTR: potential mediators of injury-induced apoptosis in the mouse dorsal root ganglion. *Brain research*. 2007;1183:32-42.
338. Vaegter CB, Jansen P, Fjorback AW, Glerup S, Skeldal S, Kjolby M, et al. Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling. *Nature neuroscience*. 2011;14(1):54-61.

339. Choi S, Friedman WJ. Interleukin-1beta enhances neuronal vulnerability to proNGF-mediated apoptosis by increasing surface expression of p75(NTR) and sortilin. *Neuroscience*. 2014;257:11-9.
340. Morris NJ, Ross SA, Lane WS, Moestrup SK, Petersen CM, Keller SR, et al. Sortilin is the major 110-kDa protein in GLUT4 vesicles from adipocytes. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(6):3582-7.
341. Rabizadeh S, Oh J, Zhong LT, Yang J, Bitler CM, Butcher LL, et al. Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science*. 1993;261(5119):345-8.
342. Serup Andersen O, Boisguerin P, Glerup S, Skeldal S, Volkmer R, Willnow TE, et al. Identification of a linear epitope in sortilin that partakes in pro-neurotrophin binding. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(16):12210-22.
343. Skeldal S, Sykes AM, Glerup S, Matusica D, Palstra N, Autio H, et al. Mapping of the interaction site between sortilin and the p75 neurotrophin receptor reveals a regulatory role for the sortilin intracellular domain in p75 neurotrophin receptor shedding and apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(52):43798-809.
344. Rowe RK, Harrison JL, Thomas TC, Pauly JR, Adelson PD, Lifshitz J. Anesthetics and analgesics in experimental traumatic brain injury: Selection based on experimental objectives. *Lab animal*. 2013;42(8):10.1038/labana.257.
345. Thau-Zuchman O, Shohami E, Alexandrovich AG, Trembovler V, Leker RR. The anti-inflammatory drug carprofen improves long-term outcome and induces gliogenesis after traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*. 2012;29(2):375-84.
346. Cernak I, O'Connor C, Vink R. Inhibition of cyclooxygenase 2 by nimesulide improves cognitive outcome more than motor outcome following diffuse traumatic brain injury in rats. *Experimental brain research*. 2002;147(2):193-9.
347. Gopez JJ, Yue H, Vasudevan R, Malik AS, Fogelsanger LN, Lewis S, et al. Cyclooxygenase-2-specific inhibitor improves functional outcomes, provides neuroprotection, and reduces inflammation in a rat model of traumatic brain injury. *Neurosurgery*. 2005;56(3):590-604.
348. Nittel N. Einfluss von perioperativer Analgesie nach Schädel-Hirn-Trauma und Subarachnoidalblutung bei der Maus auf sekundäre pathophysiologische Prozesse sowie Schmerzbelastung der Versuchstiere. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2012.
349. Adamson TW, Kendall LV, Goss S, Grayson K, Touma C, Palme R, et al. Assessment of Carprofen and Buprenorphine on Recovery of Mice after Surgical Removal of the Mammary Fat Pad. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*. 2010;49(5):610-6.
350. Goecke JC, Awad H, Lawson JC, Boivin GP. Evaluating postoperative analgesics in mice using telemetry. *Comparative medicine*. 2005;55(1):37-44.
351. Tacke S, Xiong H, Schimke E. [Sevoflurane (SEVOrane) as an inhalation anesthetic in dogs in comparison with halothane and isoflurane]. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere*. 1998;26(6):369-77.
352. Albrecht M, Henke J, Tacke S, Markert M, Guth B. Influence of repeated anaesthesia on physiological parameters in male Wistar rats: a telemetric study about isoflurane, ketamine-xylazine and a combination of medetomidine, midazolam and fentanyl. *BMC veterinary research*. 2014;10(1):963.
353. Staib-Lasarik I, Kriege O, Timaru-Kast R, Pieter D, Werner C, Engelhard K, et al. Anesthesia for euthanasia influences mRNA expression in healthy mice and after traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*. 2014;31(19):1664-71.
354. Karmarkar SW, Bottum KM, Tischkau SA. Considerations for the use of anesthetics in neurotoxicity studies. *Comparative medicine*. 2010;60(4):256-62.

12. Danksagung

Vorab möchte ich Herrn Prof. Christian Werner und Frau Prof. Kristin Engelhard danken, dass ich die Möglichkeit bekommen habe an der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin in Mainz im Rahmen meiner Anstellung als Tierärztin meine Dissertation anzufertigen und dieses interessante Thema zu bearbeiten.

Herrn Prof. Michael Schäfer möchte ich für die gute Betreuung, die konstruktiven Anregungen und die sorgfältige Korrektur meiner Arbeit danken.

In Herrn Prof. Joachim Roth habe ich einen hilfsbereiten Doktorvater an der Justus-Liebig-Universität in Gießen gefunden, dem mein Dank für die Übernahme der Betreuung der externen Promotion sowie für seine stets freundliche Art und seine schnelle Korrektur gilt.

Herrn PD Dr. Serge Thal danke ich für die anregenden Diskussionen zu meinem Thema.

Bei Frau Dr. Anne Sebastiani möchte ich mich für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung meiner Doktorarbeit, sowie bei der Vorbereitung und Anfertigung der Publikationen und Vorträge herzlich bedanken.

Frau Frida Kornes trägt als gute Seele des Labors maßgeblich für die angenehme Arbeitsatmosphäre bei. Dafür und für die logistische Hilfe bei der Durchführung der Studien sowie für die Stil- und Formkorrektur dieser Arbeit möchte ich mich bei ihr bedanken.

Frau Dana Pieter und Herrn Tobias Hirnet danke ich für die tatkräftige Unterstützung meiner Projekte. Bedanken möchte ich mich weiterhin bei Herrn Prof. Bernd Moosmann in dessen Labor ich mit Hilfe von Herrn Dr. Matthias Granold die Technik des Western Blots lernen durfte, sowie bei Frau Larissa Dangel und Frau Wiesia Bobkiewicz für ihre stets freundliche und hilfsbereite Art bei der Adaption der Western Blot Technik auf unser System.

Meinen Kollegen, die Herren Dr. Tobias Krämer, Lutz Menzel, Dr. Bruno Pöttker, Wilhelm Christaller sowie unseren medizinischen Doktoranden danke ich für die gute Stimmung in unserem Labor.

Bei meinen guten Freunden möchte ich mich bedanken, da ich mit ihnen beim Reiten, Spazieren gehen oder Tanzen, bei einer Tasse Kaffee oder einem Glas guten Wein immer neue Energie tanken kann, wenn der Stress zu viel wird.

Überdies geht mein Dank an meine wunderbare Familie, die mich alle auf ihre eigene Art unterstützt haben: meine bezaubernden Nichten, die mir immer wieder ein Lächeln ins Gesicht zaubern, meine Eltern, die immer für mich da sind und meine Schwester ohne deren Unterstützung und deren verrückte Art das Leben nur halb so wundervoll wäre.

Zuletzt möchte ich von Herzen meinen Großeltern danken, dass sie mir die Liebe zu den Tieren und das Interesse für die Medizin mit auf meinen Weg gegeben haben. Ohne sie wären mein Studium und die Dissertation nie möglich gewesen.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6440-2



9 783835 196440 2